

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

#### Effets des immunostimulants sur la réponse immunitaire et la régulation de l'expression des TLR chez un poisson-chat asiatique, *Pangasianodon hypophthalmus*

Tinti, Emmanuel

*Award date:*  
2010

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Université Catholique de Louvain  
École de Biologie

Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix  
Département de Biologie



Effets des immunostimulants sur la réponse immunitaire et la régulation de  
l'expression des TLR chez un poisson-chat vietnamien,  
*Pangasianodon hypophthalmus*

TINTI Emmanuel

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme  
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteurs : Patrick Kestemont (URBO, FUNDP)  
Nguyen Thanh Phuong (CAF, Can Tho University)

Année académique 2009 – 2010

Université Catholique de Louvain  
École de Biologie

Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix  
Département de Biologie



Effets des immunostimulants sur la réponse immunitaire et la régulation de  
l'expression des TLR chez un poisson-chat vietnamien,  
*Pangasianodon hypophthalmus*

TINTI Emmanuel

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme  
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteurs : Patrick Kestemont (URBO, FUNDP)  
Nguyen Thanh Phuong (CAF, Can Tho University)

Année académique 2009 – 2010

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ici toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien le travail qui vous est présenté.

Tout d'abord, je remercie Neil Wang, mon encadrant journalier, ainsi que le professeur Patrick Kestemont, mon promoteur, pour leurs nombreux conseils, leur disponibilité et leur engagement dans la réalisation de la rédaction.

Ensuite, je remercie Sophie Massart et Sylvain Milla, qui m'ont beaucoup aidé, tant au point de vue manipulations que rédaction.

Enfin, je remercie l'équipe du professeur Nguyen Thanh Phuong de l'Université de Can Tho pour son soutien et son aide précieuse lors des 3 mois passés au Vietnam.

Ma gratitude va aussi envers ma famille, pour leurs encouragements durant cette année passée en tant que mémorisant.

A toutes et à tous, ainsi qu'aux autres mémorants BOE, merci.

*« Le savoir que l'on ne complète pas chaque jour diminue tous les jours. »*

Proverbe Chinois



RESUME

**Effets des immunostimulants sur la réponse immunitaire et la régulation de l'expression des TLR chez un poisson-chat vietnamien, *Pangasianodon hypophthalmus***

*Pangasianodon hypophthalmus* est un poisson-chat asiatique économiquement très important et soumis au risque bien connu en aquaculture que sont les infections bactériennes (*Edwardsiella ictaluri* dans le cas présent). C'est pourquoi nous nous sommes penchés, dans ce travail, sur les effets des immunostimulants sur la réponse immunitaire et la régulation de l'expression des TLR. Comme tous les poissons Teleostei, *P. hypophthalmus* présente lors d'une attaque de pathogène une réponse immunitaire innée et adaptative, la première étant largement prédominante. Cette réponse ne peut être activée que par la reconnaissance préalable du pathogène par des récepteurs cellulaires, dont la famille la plus importante est celle des *Toll-like Receptors* (TLR). Ceux-ci sont capables de reconnaître toute une série de *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), dont le lipopolysaccharide bactérien (LPS), un constituant essentiel de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif. L'utilisation de cette molécule comme immunostimulant peut constituer une alternative à l'usage d'antibiotiques dans l'aquaculture de *P. hypophthalmus*. Dans cette optique, les objectifs de ce travail étaient : 1°) d'évaluer jusqu'à quel point les immunostimulants peuvent améliorer la réponse immunitaire chez *P. hypophthalmus* et réguler l'expression des TLR, 2°) de vérifier si les immunostimulants peuvent protéger *P. hypophthalmus* contre les pathogènes, 3°) d'évaluer la durée effective de cette protection. Au vu des résultats obtenus et des informations disponibles dans la littérature scientifique actuelle, le LPS ne semble pas améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire de *P. hypophthalmus* lors d'un challenge test avec *E. ictaluri*, et ne semble donc pas constituer une protection effective contre les pathogènes. Etant donné l'état non achevé de la manipulation concernant l'expression des TLR, nous ne pouvons pas conclure quant à l'action d'immunostimulants comme le LPS sur ceux-ci.

**ABSTRACT**

**Effects of immunostimulants on the immune response and the regulation of TLR expression in an Asian catfish, *Pangasianodon hypophthalmus***

*Pangasianodon hypophthalmus* is an economically important Asian catfish and it is subjected to the well known aquaculture risk of bacterial infection (*Edwardsiella ictaluri* in this case). What is the reason why we studied, in this work, the effects of immunostimulants on the immune response and the regulation of TLR expression. Like all Teleostei, *P. hypophthalmus* presents during a pathogen attack an innate and an adaptative immune response, the first predominating the second. This response may be activated only by the previous recognition of pathogen by cellular receptors, which the most important family is the Toll-like Receptors one (TLR). They are able to recognize a series of Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), of which the lipopolysaccharid (LPS), an essential constituent of the Gram negative bacterial cell wall. The use of this molecule as an immunostimulant may constitute an alternative to the use of antibiotics in *P. hypophthalmus* aquaculture. In this perspective, the objectives of this work are: 1°) assessing to which extent immunostimulants enhance the immune response of *P. hypophthalmus* and regulate TLR expression, 2°) verifying whether immunostimulants protect *P. hypophthalmus* against pathogens, and 3°) assessing how much time the protection is effective. According to our results and the current scientific literature, LPS doesn't seem to enhance the efficiency of *P. hypophthalmus* immune response during an *E. ictaluri* challenge test, so it doesn't constitute an effective protection against pathogens. According to the no completed condition of the TLR expression manipulation, we don't conclude regarding the action of immunostimulant like LPS on these ones.

# TABLE DES MATIERES

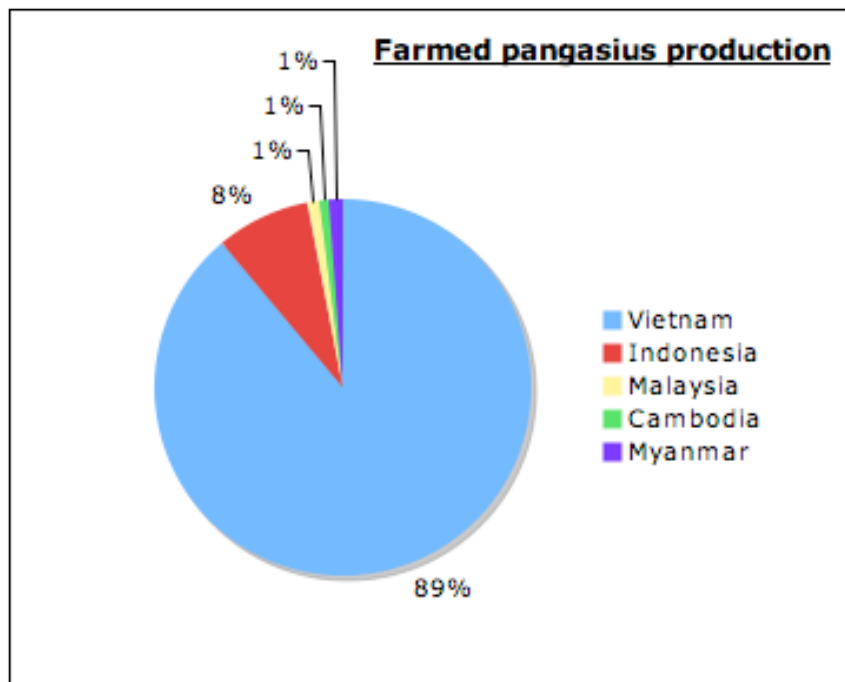
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>3</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>6</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Pangasius et aquaculture au Vietnam.....</b>	<b>9</b>
a. Aquaculture .....	9
1°) Vietnam .....	9
2°) Poisson .....	9
3°) Pangasius.....	9
4°) Quelques chiffres.....	10
b. Pangasius.....	10
1°) Systématique .....	10
2°) Biologie .....	10
3°) Ecologie.....	11
<b>2. Immunité.....</b>	<b>12</b>
a. Définition.....	12
b. Système immunitaire .....	12
1°) Cytologie, histologie et anatomie .....	12
2°) Physiologie.....	14
c. Immunité innée .....	14
1°) Présentation .....	14
2°) Mécanismes passifs de l'immunité innée.....	14
3°) Lysozyme .....	15
4°) Immunité innée cellulaire et humorale.....	15
5°) Système du complément .....	16
6°) Cibles de l'immunité innée .....	17
7°) Récepteurs de l'immunité innée .....	17
8°) <i>Toll-like Receptors</i> et adaptateurs moléculaires .....	18
9°) Voies d'activation de l'immunité innée .....	19
d. Immunité adaptative .....	20
1°) Présentation .....	20
2°) Mécanismes de l'immunité adaptative.....	20
3°) Immunité adaptative cellulaire et humorale.....	20
4°) Cibles de l'immunité adaptative .....	21
5°) Récepteurs de l'immunité adaptative .....	21
6°) Immunité innée <i>versus</i> adaptative .....	22
7°) Intérêt d'une réponse immunitaire adaptative .....	22
<b>3. Immunostimulation .....</b>	<b>22</b>
a. Généralités.....	22
1°) Traitement des poissons contre les maladies .....	22
2°) Immunostimulation et immunostimulants .....	23
3°) Catégories d'immunostimulants .....	23
4°) Voies d'administration .....	23
5°) Effet des immunostimulants sur le système immunitaire .....	24

b. Lipopolysaccharide bactérien .....	24
1°) Présentation .....	24
2°) Reconnaissance du LPS .....	25
3°) Effets pathologiques du LPS .....	26
4°) Immunostimulation .....	26
<b>II. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Problématique des antibiotiques et des maladies .....</b>	<b>28</b>
a. Maladies .....	28
1°) Maladie chez les poissons d'aquaculture .....	28
2°) <i>Edwardsiella ictaluri</i> .....	28
b. Antibiotiques et résistance aux antibiotiques .....	29
<b>2. Objectifs .....</b>	<b>30</b>
<b>III. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>31</b>
<b>1. Protocole expérimental .....</b>	<b>31</b>
<b>2. Elevage et échantillonnage .....</b>	<b>31</b>
a. Poissons .....	31
b. Elevage .....	31
1°) Acclimatation .....	31
2°) Préparation de la nourriture pour poissons et nourrissage .....	31
3°) Challenge test et préparation de la solution bactérienne .....	32
c. Echantillonnage et prélèvements .....	33
1°) Périodes d'échantillonnage .....	33
2°) Prélèvements .....	33
<b>3. Mesure de la réponse au stress .....</b>	<b>34</b>
a. Cortisol .....	34
b. Glucose .....	34
<b>4. Mesure de la réponse immunitaire .....</b>	<b>35</b>
a. Lysozyme .....	35
b. Immunoglobulines .....	36
c. Complément et NBT .....	37
<b>5. Mesure de la régulation de l'expression des TLR et des molécules auxiliaires .....</b>	<b>37</b>
a. Sélection des gènes d'intérêts .....	37
b. Obtention des primers des gènes d'intérêts .....	38
1°) Design de primers dégénérés .....	38
2°) Extraction d'ARN à partir de tissus frais .....	38
3°) <i>Reverse Transcription</i> (RT) .....	39
4°) <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	40
5°) Electrophorèse sur gel d'agarose .....	40
c. Production des amorces des gènes d'intérêt .....	41
1°) Purification de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose .....	41
2°) Clonage en bactéries .....	42
3°) PCR à partir d'un clonage en bactéries .....	43
4°) Séquençage des gènes d'intérêt .....	43
d. Quantification de l'expression des gènes d'intérêts .....	43
1°) Extraction d'ARN à partir de tissus frais .....	43
2°) <i>Reverse Transcription</i> (RT) .....	43
3°) <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (Q-PCR) .....	44
<b>6. Traitement statistique des données .....</b>	<b>44</b>
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>46</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>46</b>
<b>2. Suivi de la mortalité .....</b>	<b>46</b>

<b>3. Mesure de la réponse au stress .....</b>	<b>47</b>
a. Cortisol .....	47
b. Glucose.....	49
<b>4. Mesure de la réponse immunitaire .....</b>	<b>50</b>
a. Lysozyme .....	50
1°) Lysozyme plasmatique.....	50
2°) Lysozyme dans la rate .....	51
b. Immunoglobulines .....	53
<b>5. Mesure de la régulation de l'expression des TLR et des molécules auxiliaires .....</b>	<b>55</b>
a. Sélection des gènes d'intérêts .....	55
b. Obtention des primers des gènes d'intérêts.....	55
1°) Design de primers dégénérés .....	55
2°) Extraction d'ARN, RT, PCR et gel d'électrophorèse .....	55
c. Production des amorces des gènes d'intérêt.....	56
1°) Purification de fragments d'ADN, clonage en bactéries, PCR en bactéries et gel d'électrophorèse.....	56
2°) Séquençage des gènes d'intérêt .....	56
d. Quantification de l'expression des gènes d'intérêts .....	56
 <b>V. DISCUSSION .....</b>	 <b>57</b>
1. Réponse au stress.....	57
2. Effets du LPS sur la réponse immunitaire .....	60
3. Effets du challenge test sur la réponse immunitaire.....	63
4. Mesure de la régulation de l'expression des TLR et des molécules auxiliaires .....	65
 <b>VI. CONCLUSION .....</b>	 <b>68</b>
 <b>VII. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	 <b>70</b>
1. Ouvrages de référence .....	70
2. Articles.....	70
3. Outils multimédia .....	77
 <b>VIII. ANNEXES .....</b>	 <b>79</b>



**Figure 1. Localisation du Vietnam et du Delta du Mékong**  
(<http://hereticdhammasangha.files.wordpress.com>).



**Figure 2. Production de pangasius issu de fermes d'élevage par pays (Corsin 2008).**

## I. INTRODUCTION

### 1. Pangasius et aquaculture au Vietnam

#### a. Aquaculture

##### 1°) Vietnam

Le Vietnam (**Figure 1**) est le septième pays exportateur de produits de l'aquaculture dans le monde, et celle-ci représente le troisième secteur d'activité du pays après le textile et le pétrole. L'aquaculture est une activité rurale importante sans cesse croissante dans le Delta du Mékong, fournissant nourriture et rentrées d'argent à de nombreux ménages. Le développement de celle-ci jouera à l'avenir un rôle critique dans la contribution à la demande alimentaire (accroissement de 400 000 T pour les 10 ans à venir de façon à subvenir à la demande croissante de consommation) (Commission 2002; Dung et al. Undated).

##### 2°) Poisson

Diverses espèces de poissons sont utilisées en aquaculture piscicole au Vietnam (Commission 2002; Dung et al. Undated) : les pangasius sutchi (*Pangasianodon hypophthalmus*) et bocourti (*P. bocourti*), les carpes communes (*Cyprinus carpio*) et argentées (*Hypophthalmichthys molitrix*), les barbus argentés (*Barbodes gononiotus*) et à queue rouge (*Barbodes altus*), des tilapias (principalement *Oreochromis niloticus* et *O. mossambicus*), le gourami géant (*Osphronemus gourami*), le gobie des sables (*Oxyeleotrix marmoratus*), et l'ophiocéphale strié (*Channa striatus*).

##### 3°) Pangasius

Un des plus grands types d'aquaculture au monde est celle du pangasius (110 000 T de production en 2008), dont la majorité de la production mondiale (89 %) provient du Vietnam (**Figure 2**). Celle-ci a commencé en 1970 avec de petits effectifs, pour atteindre en 2007 un million de tonnes de poissons élevés (Corsin 2008). Les poissons sont élevés soit dans des cages en rivière soit dans des bassins de 10 000 m<sup>2</sup> généralement (pouvant aller jusqu'à 100 000 m<sup>2</sup>), comportant de 60 à 80 poissons/m<sup>3</sup> (il existe un système extensif d'aquaculture en alternance avec la

**Tableau 1. Aquaculture au Vietnam en 2006 (General Statistics Office of Vietnam, 2006).**

Aquaculture au Vietnam (2006)			
<i>Surface disponible (km<sup>2</sup>)</i>			
Total Vietnam	9,765	Total Can Tho	0,136
Eau douce	2,935		
Poissons	2,838		
<i>Nombres de fermes d'élevages piscicoles</i>			
Total Vietnam	113730	Total Can Tho	305
Poissons Vietnam	34202	Poissons Can Tho	156
<i>Production de produits aquatiques (10<sup>6</sup> T)</i>			
Total Vietnam	3,7205	Fermes de poissons Can Tho	0,11009
Fermes Vietnam	1,6939		
Poissons Vietnam	1,1571		

**Tableau 2. Classification détaillée de *P. hypophthalmus* (NCBI; FishBase).**

- Division : Eukaryota
  - Super-règne : Opisthokonta
  - Règne : Animalia
  - Sous-règne : Eumetazoa
    - Clade : Bilateria
    - Clade : Coelomata (Triploblastida)
    - Clade : Deuterostomia
      - Embranchement : Chordata
      - Clade : Craniata
      - Sous-embranchement : Vertebrata
      - Clade : Gnathostomata
        - Super-classe : Osteichthyes
        - Classe : Actinopterygii
        - Sous-classe : Neopterygii
        - Infra-classe : Teleostei
          - Super-ordre : Ostariophysi
          - Ordre : Siluriformes
            - Famille : Pangasiidae
              - Espèce : *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878
              - Synonyme : *Pangasius sutchi*, Cá Tra (vietnamien), Iridescent shark-catfish (anglais)



**Figure 3. *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878 (FishBase).**



culture du riz) (Commission 2002). Ce système requiert une qualité de l'eau acceptable (le pangasius est une espèce assez tolérante, puisqu'il se nourrit de déchets que l'on retrouve, par exemple, dans les eaux usées), dont le renouvellement (20-30 % deux fois par semaine) est assuré par une pompe. La plus grande partie de la production concerne *Pangasianodon hypophthalmus* (« *tra catfish* »), un faible pourcentage revenant à *P. bocourti* (« *basa catfish* »). Pangasius est exporté majoritairement en Europe (48 %), loin devant la Russie (9,2 %), l'Asie (7,9 %) et les USA (6,9 %) (Corsin 2008).

#### 4°) Quelques chiffres

Dans le **Tableau 1** sont présentées les statistiques nationales officielles pour 2006 concernant la surface disponible en eau, les fermes et la production aquacole (Vietnam 2009).

#### b. Pangasius

##### 1°) Systématique

Le **Tableau 2** présente la classification détaillée de *P. hypophthalmus*.

##### 2°) Biologie

- Description et morphologie

*P. hypophthalmus* (**Figure 3**) est un poisson dont la longueur peut atteindre 130 cm et pouvant peser jusqu'à 44 kg (6-7 kg généralement) (Roberts and Vidthayanon 1991).

Son corps, d'aspect brillant et irisé chez les jeunes, avec deux bandes noires le long de la ligne latérale, devient gris foncé chez les adultes. Ses nageoires, sombres, présentent des caractéristiques propres : dorsale à six rayons, ligne noire au milieu de la nageoire anale, caudale rosée (adulte), avec une bande sombre sur les lobes (FishBase 2009).

Il est à noter son système branchial particulier, alternant petites et plus grandes branchies (Roberts and Vidthayanon 1991).

- Régime alimentaire

*P. hypophthalmus* est un poisson omnivore/détritivore au régime varié, allant du plancton (phytoplancton et zooplancton) aux macrophytes et insectes. Dans

les portions plus larges des rivières, il peut aussi consommer des fruits, des crustacés et des poissons.

### 3°) Ecologie

- Habitat et distribution

*P. hypophthalmus* se retrouve exclusivement en Asie du Sud-Est, où il est endémique des bassins du Mékong et du Chao Phraya (entre 8° et 19° de latitude nord). Ces deux bassins d'eau douce tropicale (22-26°C) ont un pH compris entre 6,5 et 7,5 et une dureté de 2 à 29 dH. Il est à noter que les espèces du genre ont été introduites dans toute cette partie de l'Asie pour l'aquaculture (FishBase 2009).

C'est un poisson migrateur, que l'on peut parfois retrouver loin des fleuves (dans les zones inondées pendant la saison des pluies, alors qu'il affectionne les estuaires pendant la saison sèche), benthopélagique et potamodrome (grandes étendues d'eaux profondes) (Roberts and Vidthayanon 1991).

- Populations

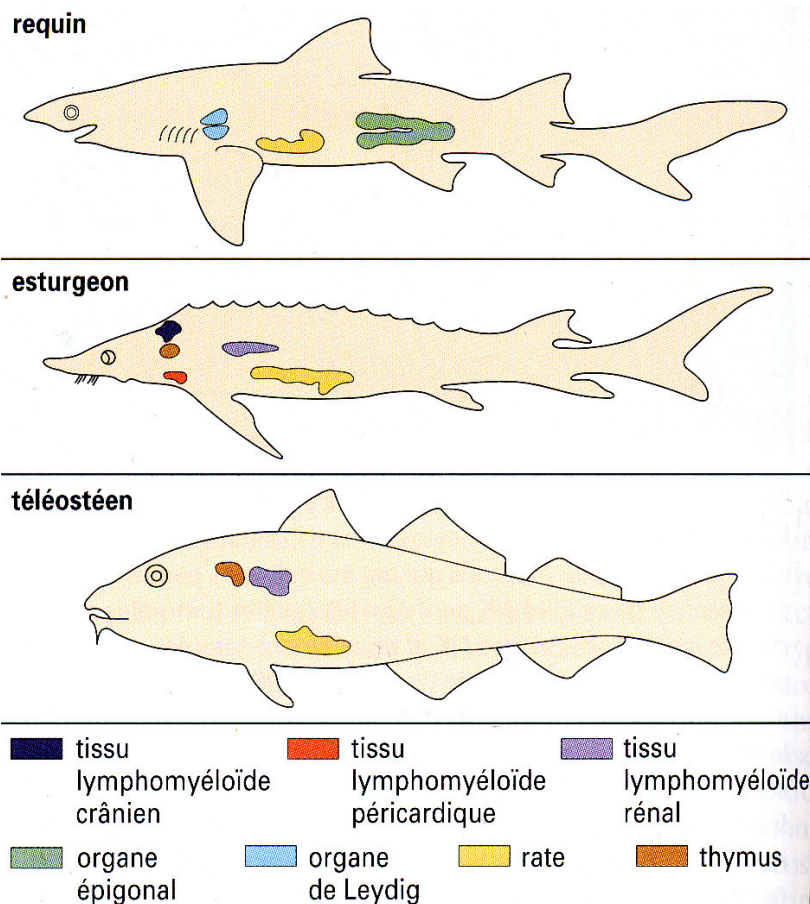
Au niveau de la rivière Mékong, *P. hypophthalmus* se répartirait en cinq populations cryptiques (sympatriques) se partageant les mêmes lieux de ponte et d'alevinage mais à des moments différents de l'année, ne se mélangeant qu'au niveau des lieux de nourrissage (Poulsen et al. 2008).

- Cycle de vie

Lors de la mousson (mai-juin), les adultes remontent le Mékong jusqu'au nord du Cambodge, au niveau des villes de Kratie et Stung Treng. Cette zone est propice au frai de par son fort courant et ses zones profondes. Elle servirait aussi de zone refuge pendant la saison des pluies.

Les œufs sont déposés sur les racines de certaines espèces de plantes.

Vers le mois d'août, les adultes redescendent la rivière pour regagner leurs zones de répartition initiales (Poulsen et al. 2008).



**Figure 4. Système immunitaire chez les Gnathostomata (Roitt et al. 2002).**

## 2. Immunité

### a. Définition

Les êtres vivants constituent un environnement riche en nutriments et un substrat particulièrement favorable à la croissance et à la multiplication de nombreux microorganismes. Parmi ceux-ci, certains sont doués d'une certaine pathogénicité : on parlera alors de microorganismes pathogènes (virus, bactéries, protistes – champignons, protozoaires, ... –, animaux – helminthes, ...).

L'immunité peut se définir comme étant la propriété que possèdent les organismes vivants de développer des moyens spécifiques de défense (naturels ou acquis) contre de tels agents pathogènes ou contre un corps étranger (greffe). Dès lors, le système immunitaire rassemblera l'ensemble des constituants participant à la lutte incessante contre l'invasion de l'individu par ces microorganismes.

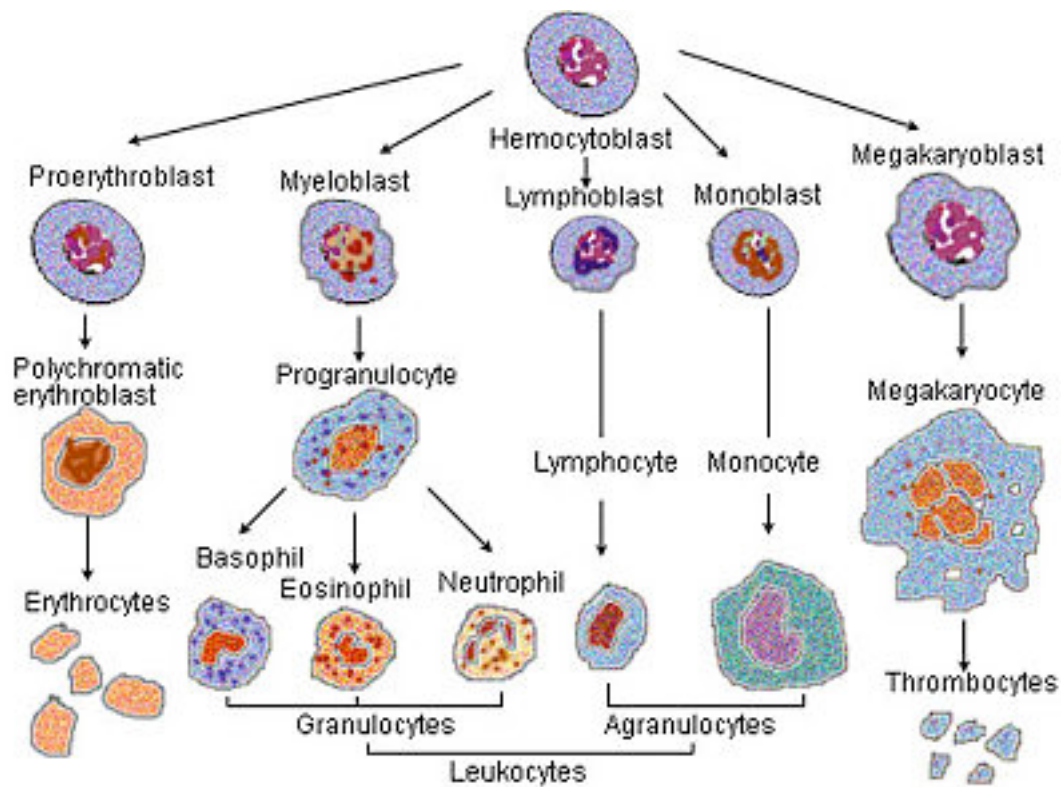
### b. Système immunitaire

#### 1°) Cytologie, histologie et anatomie

De même que chez les mammifères, le système immunitaire des poissons n'est pas localisé en un endroit précis du corps. Il correspond en fait à un système diffus, dont l'interaction est assurée par les cellules (leucocytes ou « globules blancs ») et les molécules de l'immunité via la circulation sanguine. Cependant, les tissus et les organes lymphoïdes constituant le système immunitaire diffèrent en fonction des espèces (**Figure 4**) (Zapata et al. 1996; Roitt et al. 2002; Tort et al. 2003).

Chez les poissons primitifs (Agnatha), comme les myxines (Myxiniiformes) et les lamproies (Petromyzontiformes), le système immunitaire consiste juste en une série de cellules et de tissus lymphoïdes localisés dans les organes, tels que la tête, le pronéphros et l'intestin (où l'on retrouve un tissu analogue à la moelle osseuse), avec cependant des ébauches de rate et de moelle chez les lamproies.

Chez les poissons cartilagineux (Chondrichthyes), tels que les requins et les raies, il existe trois organes lymphoïdes typiques : l'organe de Leydig (parois de l'œsophage), la valve spirale (intestin) et les organes épigonaux (structures analogues à la moelle osseuse entourant les gonades). A côté de cela, on retrouve des organes plus classiques comme le thymus et la rate (organe lymphoïde le plus important chez ces espèces).



**Figure 5. Cellules sanguines** (<http://static.newworldencyclopedia.org>).

Chez les Chondrostei (esturgeons et polyptères), le rein est l'organe principal de l'immunité, avec un site associé aux méninges et un autre péricardique.

Chez les poissons les plus évolués (Teleostei), l'organe immunitaire le plus important est le rein, particulièrement la partie antérieure de celui-ci (organe hématopoïétique où se déroule la génération des cellules phagocytaires, le processing antigénique, la formation des IgM et la mémoire immunologique via les centres mélanomacrophagiques) (Tort et al. 2003). Comme chez les mammifères, le thymus et la rate jouent un rôle non négligeable (respectivement, maturation des lymphocytes, filtration immunologique du sang et de la lymphe) (Anderson 1977; Hansen and Zapata 1998). Chez les poissons, le thymus prend en plus en charge la filtration du sang et la destruction des érythrocytes, au niveau des centres mélanomacrophagiques. Contrairement aux autres vertébrés, on ne retrouve pas de ganglions lymphoïdes ni de moelle osseuse, et on ne peut que supposer la présence de *Mucosa Associated Lymphoid Tissues* (MALT) dans différents tissus non lymphoïdes, comme les GALT du tractus digestif (*Gut ALT*, tissus lymphoïdes non organisés et agrégats, comportant des macrophages, des granulocytes et des lymphocytes intraépithéliaux IEF) (Matsunaga and Rahman 1998; Roitt et al. 2002). Il est à noter que les hippocampes (ordre des Syngnathiformes, famille des Syngnathidae) sont dépourvus de GALT (Matsunaga and Rahman 1998).

C'est au niveau de tous ces organes, ainsi que dans le sang, que l'on va retrouver les cellules de l'immunité : les leucocytes (**Figure 5**). Ceux-ci se divisent en deux groupes : les granulocytes (polymorphonucléaires), avec les neutrophiles (PMN), les éosinophiles et les basophiles/mastocytes ; et les agranulocytes, avec les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes conventionnels et non conventionnels T (LT), B/plasmocytes (LB), et les *Innates T-like Cells* (*cytotoxic Natural Killer-like cells* NK et *Non-specific Cytotoxic Cells* NCC) (Miller et al. 1998; Plouffe et al. 2005). Il est à noter que, chez les poissons, les épithéliocytes, qui ne sont pas des leucocytes, participent aussi à la réponse immunitaire (Magnadottir 2006).

**Tableau 3. Immunité innée et adaptative (Janeway and Medzhitov 2002).**

<b>Propriété</b>	<b>Réponse innée</b>	<b>Réponse adaptative</b>
Spécificité	Non spécifique Préexistante	Spécifique Adaptation au pathogène
Ligands	Structures communes des pathogènes (PAMPs)	Structures particulières des pathogènes (antigènes)
Récepteurs	Encodés dans la lignée germinale, diversité limitée : TLR, NLR, RLR, mannose receptors, ...	Encodés dans la lignée somatique (recombinaison de segments de gènes), grande diversité : TCR, BCR, Ig
Distribution	Non clonale, toutes les cellules d'une classe identique	Clonale, toutes les cellules d'une classe distincte
Activation	Directe, par le pathogène	Indirecte, par la réponse innée
Mémoire à long terme	Au niveau de l'évolution des organismes : oui Au niveau de l'individu : non	Au niveau de l'évolution des organismes : non Au niveau de l'individu : oui
Effecteurs	Inflammation, complément, granulocytes, macrophages, DC, NK, NCC	Lymphocytes T et B, Ig

## 2°) Physiologie

Le système immunitaire est composé de deux éléments essentiels : les détecteurs, qui identifient les microorganismes comme étant pathogènes et susceptibles de nuire au bon fonctionnement de l'organisme, et les effecteurs, qui se chargeront d'éliminer les pathogènes.

Au sein de la réponse immunitaire, deux types de réponse interviennent selon des modalités bien déterminées : l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Tableau 3**) (Janeway and Medzhitov 2002; Magnadottir 2006).

Lors de la détection d'un microorganisme étranger, c'est la réponse innée qui intervient en premier. Par la suite, les acteurs du système adaptatif sont recrutés.

Les deux réponses agissent donc en synergie.

### c. Immunité innée

#### 1°) Présentation

L'immunité innée est apparue très tôt dans l'évolution, puisque l'on retrouve des mécanismes moléculaires de réponse à l'invasion par un microorganisme infectieux similaires chez les animaux et chez les plantes : récepteurs de détection des pathogènes très conservés, peptides antimicrobiens, transduction du signal par *Mitogen-Associated Protein kinases* (MAP kinases), ... Ceci suppose une origine antérieure à la divergence de ces deux règnes d'Eucaryotes (-1000 Ma) (Aoki et al. 2008).

L'immunité innée remplit trois rôles principaux (Medzhitov and Janeway 2000b) : contenir l'infection avant l'activation de l'immunité adaptative, déclencher l'activation de cette dernière, et déterminer le type de réponse effectrice la plus appropriée pour lutter contre les pathogènes.

Aussi bien chez les mammifères que chez les poissons, la réponse innée se compose d'une part de mécanismes de protection passifs, et d'autre part de la réponse innée active en elle-même, cellulaire ou humorale.

#### 2°) Mécanismes passifs de l'immunité innée

Parmi les mécanismes passifs, citons les barrières physiques (épithélia, flux de liquides et de mucus, présence de cils, ...), chimiques (pH, acides gras, peptides antimicrobiens, enzymes, lysozyme, ...) et microbiologiques (flore commensale



des cavités corporelles). Ces défenses constitutives se localisent au niveau des sites d'interaction permanente avec le milieu extérieur (peau, tractus digestif, respiratoire et urogénital) et visent strictement les organismes étrangers (Medzhitov and Janeway 2000a; Galindo-Villegas and Hosokawa 2004). Dans la section suivante, nous détaillerons une de ces défenses constitutives : le lysozyme.

### 3°) Lysozyme

Chez les poissons, le lysozyme est une enzyme antibactérienne déjà présente à l'état embryonnaire. C'est un des premiers mécanismes de défense contre les pathogènes (bactéries Gram positif et Gram négatif). Ce facteur constitutif est présent en plusieurs isoformes (par exemple, deux chez la truite arc-en-ciel *Onchorhynchus mykiss*). Il peut aussi être induit par une infection bactérienne. Par exemple, chez le saumon atlantique (*Salmo salar*), une infection par *Aeromonas salmonicida* induit une augmentation de la concentration en lysozyme du sérum, ou encore, chez le cardeau (*Paralichthys olivaceus*), la transcription du lysozyme intervient 72 h après infection par *Edwardsiella tarda* (Watts et al. 2001). Le lysozyme agit au niveau de la paroi bactérienne (peptidoglycan), conduisant à la lyse de la cellule (Tort et al. 2003). On retrouve le lysozyme dans le mucus et les œufs, dans le sérum (macrophages péritonéaux et PMN). Le lysozyme est induit rapidement, et parfois de manière indépendante d'une éventuelle contamination (après un stress par exemple). Dans ce cas, il agit comme une *Acute-Phase Protein* (APP).

### 4°) Immunité innée cellulaire et humorale

A côté des défenses passives, l'immunité innée regroupe un ensemble d'effecteurs cellulaires et humoraux (solubles).

La réponse cellulaire est médiée par les leucocytes : granulocytes, macrophages, DC et lymphocytes non conventionnels (LB1, LB marginaux, NK et NCC). Ceux-ci sont activés durant la réponse inflammatoire, étape précurseur du développement d'une réponse de défense de la part de l'organisme. Ces cellules ont deux grands rôles : d'une part, mener à bien l'éradication du pathogène, et d'autre part, initier la réponse adaptative (Miller et al. 1998; Janeway et al. 2003).

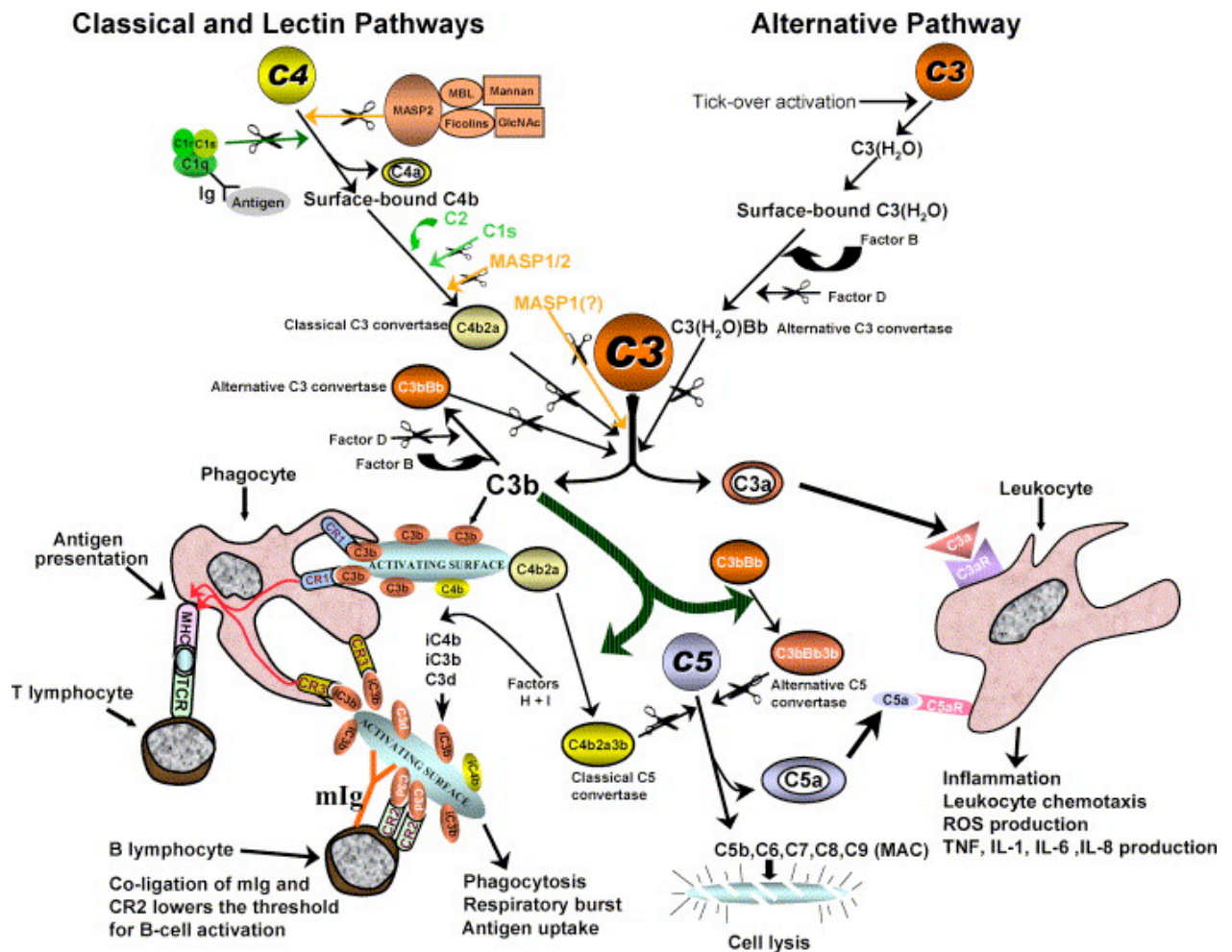


Figure 6. Système du complément (Boshra et al. 2006).

La réponse humorale est médiée par des effecteurs solubles : peptides antimicrobiens, protéases et anti-protéases ( $\alpha$ 1-antitrypsine,  $\alpha$ 2-macroglobuline), cytokines proinflammatoires (TNF-like, TGF- $\beta$ , IFN, IRF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, CK), éléments solubles du complément, APP (*C-reactive protein*, sérum amyloïde A et P), ... (Magnadottir 2006). Dans la section suivante, nous détaillerons un élément important de la réponse humorale : le complément.

#### 5°) Système du complément

Le système du complément est un mécanisme de l'immunité innée qui est apparu assez tôt dans l'évolution, avant la radiation des Vertebrata. On le retrouve donc aussi bien chez les invertébrés (Echinodermata, Urochordata) que chez les vertébrés (Agnatha et Gnathostomata) (Nonaka and Smith 2000).

Le système du complément, similaire chez les poissons et les mammifères, se compose de trois voies : classique, alternative et *Mannose-Binding Lectins* (MBL), toutes trois aboutissant à la voie lytique (voie commune finale) (**Figure 6, Tableaux 4 et 5**). Les invertébrés et les vertébrés primitifs (Agnatha) sont dépourvus de la voie classique (Matsunaga and Rahman 1998; Nonaka and Smith 2000). Ce phénomène peut être expliqué par l'absence d'immunoglobulines (Ig) chez ceux-ci (activateur de la voie), alors que les voies alternative et MBL sont Ig-indépendantes (Tort et al. 2003). Les poissons présentent une prédominance pour la voie alternative, de cinq à dix fois plus efficace que chez les mammifères (Magnadottir 2006).

Les activités du complément sont de type lytique, proinflammatoire, chimotactique et opsonique.

Une différence notable entre les mammifères et les poissons est que, chez ces derniers, certains éléments (C3, C4, C5 et Bf) présentent plusieurs isoformes, produites par différents gènes et ayant des efficacités de liaison variable (Plouffe et al. 2005). Le nombre de ces isoformes varie d'une espèce à l'autre. Par exemple, pour C3, on retrouve trois isoformes chez le medaka (*Oryzias latipes*) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*), quatre chez *Oncorhynchus mykiss*, cinq chez la dorade royale (*Sparus aurata*), et huit chez *Cyprinus carpio* (Watts et al. 2001).

**Tableau 4. Les quatre voies du système du complément (Nonaka and Smith 2000).**

Voie classique	Voie MBL	Voie alternative
C1 reconnaît un complexe Antigène-Ig.	Les protéines MASP ( <i>MBL-Associated Serine Proteases</i> ) reconnaissent le complexe lectines-mannoses.	Par activation spontanée, C3 lie une molécule d'eau pour former le complexe C3(H <sub>2</sub> O). Le facteur D (Df) clive le facteur B (Bf) en Ba et Bb.
C1 clive C2 en C2a et C2b et C4 en C4a et C4b.	MASP clivent C2 en C2a et C2b et C4 en C4a et C4b.	
C2b et C4b forment le complexe C3 convertase (C2bC4b).		C3(H <sub>2</sub> O) et Bb forment le complexe C3 convertase (C3(H <sub>2</sub> O)Bb).
La C3 convertase clive C3 en C3a et C3b.		
C3b lie la surface du pathogène.		
<b>Voie lytique (ou voie commune finale)</b>		
C3b se lie à la C3 convertase pour former la C5 convertase (C2bC4b ou C3(H <sub>2</sub> O)Bb).		
La C5 convertase clive C5 en C5a et C5b.		
C5b se lie à C6 et C7 pour former le complexe C5b67.		
C5b67 lie C8 à la surface du pathogène et recrute C9.		
C9 polymérise et forme le complexe d'attaque membranaire (MAC), une perforine.		
MAC crée un pore dans la paroi cellulaire du pathogène, ce qui provoque un choc osmotique et la destruction du pathogène.		
<b>Dans le même temps, les acteurs solubles du complément recrutent d'autres éléments du système immunitaire via différentes modalités.</b>		
Chémotaxie : C3a, C4a et C5a recrutent des cellules proinflammatoires (macrophages et neutrophiles), grâce à une augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'expression de molécules d'adhésion.		
Opsonosation : C5a fixe le CR1 des macrophages et permet la phagocytose d'un pathogène ayant lié C3b.		

**Tableau 5. Régulation du complément au niveau de la C3 convertase (Nonaka and Smith 2000).**

Absence de pathogène	Présence de pathogène
<ul style="list-style-type: none"> <li>Complement Regulatory Proteins (CRP) <ul style="list-style-type: none"> <li>Facteur H (Hf)</li> <li>CR1</li> <li>Decay Accelerating Factor (DAF)</li> <li>Membrane Factor of Proteolysis (CD46)</li> </ul> </li> <li>Plasmatc Proteolysis Factor (If)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Propertine (Pf)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Les CRP lient C3b en déplaçant Bb.</li> <li>If clive C3b pour former iC3b, qui est inactif.</li> </ul>	Pf stabilise la C3 convertase en liant la surface du pathogène.

Ces isoformes, avec leurs multiples capacités de reconnaissance, permettent d'étendre le spectre d'activité de la réponse innée.

De même que chez les mammifères, on retrouve des protéines de liaison spécifiques, comme la *C3-Binding Protein* (Hf) et la *C4-Binding Protein* (Watts et al. 2001).

#### 6°) Cibles de l'immunité innée

Les récepteurs de la réponse innée reconnaissent des patterns moléculaires communs aux microorganismes pathogènes, appelés *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Medzhitov and Janeway 2000a).

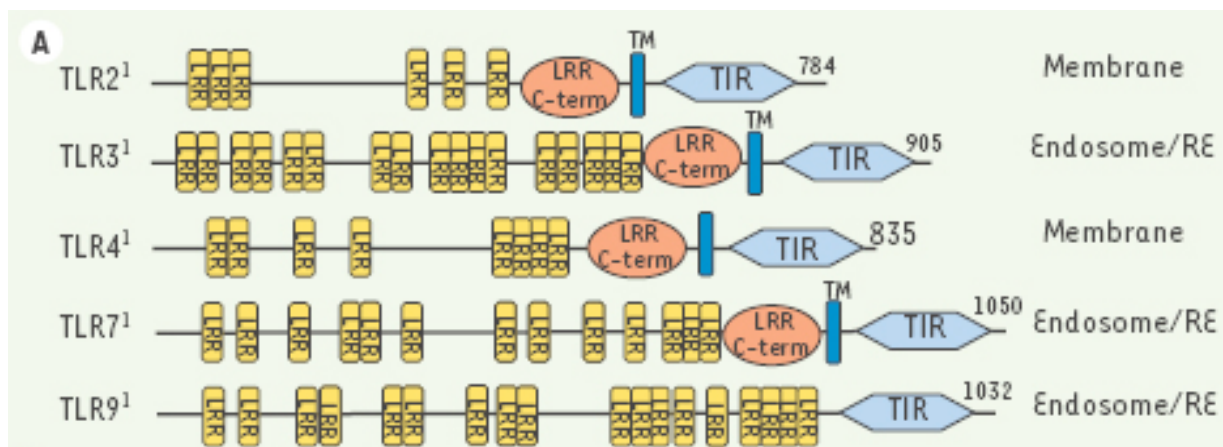
- Les PAMPs sont produits seulement par les pathogènes, ce qui permet la distinction des structures non infectieuses du soi de structures infectieuses du non soi, et sont essentiels à leur survie, d'où leur sélection comme éléments cibles de la réponse immunitaire.
- Ils sont partagés par un grand nombre de microorganismes, ce qui permet à un minimum de récepteurs encodés dans le génome d'en reconnaître une grande variété.
- Les PAMPs représentent la signature moléculaire d'une particule infectieuse, permettant de ce fait au système immunitaire de choisir la réponse appropriée.

Les récepteurs innés sont aussi capables de reconnaître les altérations du soi (modifications dans le pattern de glycosylation, dans la composition phospholipidique des membranes, ...) et l'absence de soi (MHC non reconnu par les NK).

#### 7°) Récepteurs de l'immunité innée

Il existe divers récepteurs présents sur les cellules de la réponse innée (Roitt et al. 2002), qui font partie de la grande famille des *Pattern-Recognition Receptors* (PRR) (Akira et al. 2006).

- Récepteurs aux PAMPs : *Toll-like Receptors* (TLR), *NOD-like Receptors* (NLR), *RIG-like Receptors* (RLR), MBL, ...
- Récepteurs des cellules apoptotiques : *Scavenger Receptor* (SR), récepteur à la vitronectine, ...
- Récepteurs CD (*Cluster of Differentiation Receptors*) : intégrines, ...



**Figure 7. Structure générale des TLR** ([http://edk.admin.e-dition.fr/admin/gestion\\_doc/editeur/editeur.md/e-docs/00/00/09/DF/media\\_Georgel\\_01.jpg](http://edk.admin.e-dition.fr/admin/gestion_doc/editeur/editeur.md/e-docs/00/00/09/DF/media_Georgel_01.jpg)).

- Récepteurs CR (*Complement Receptors*) : CR1, CR3, CR4.
- Récepteurs à protéines G.
- Récepteurs immunoglobuliniques (mIg) : récepteurs retrouvés sur les lymphocytes non conventionnels. La diversité des mIg est restreinte par rapport à celle des LT et LB conventionnels.

Ces récepteurs ont pour fonctions principales l'opsonisation, la phagocytose (PMN, éosinophiles, monocytes/macrophages, DC), l'activation de la cascade du complément (voies alternative et MBL), l'induction de l'apoptose (mort cellulaire programmée), et l'initiation de la transcription de gènes codant pour des éléments solubles de l'immunité (peptides antimicrobiens, cytokines proinflammatoires, ...).

Au sein des récepteurs de l'immunité innée, nous nous intéresserons plus particulièrement aux TLR, car ils interviennent dans la reconnaissance de très nombreux PAMPs, dont ceux qui nous intéresseront particulièrement dans le cadre de notre problématique.

#### 8°) *Toll-like Receptors* et adaptateurs moléculaires

Les TLR sont nommés ainsi car ils présentent des homologies structurales et des analogies fonctionnelles avec les molécules Toll de *Drosophila*, molécules intervenant dans la reconnaissance microbienne et fongique lors du développement (Roitt et al. 2002). On les retrouve chez de nombreux animaux, aussi bien invertébrés que vertébrés (Medzhitov et al. 1998).

Les TLR (**Figure 7**) sont des récepteurs transmembranaires comportant un domaine extracellulaire de liaison au pathogène (ECD) de type *Leucine-Rich Repeat* (LRR), sous forme d'un feuillet  $\beta$ , un domaine transmembranaire correspondant à une hélice  $\alpha$  et un domaine cytoplasmique de signalisation, Toll/IL-1R (TIR), appelé ainsi en raison de son homologie avec le domaine du récepteur à l'interleukine-1 (IL-1R) (Medzhitov and Janeway 2000a; Akira et al. 2006; Pandey and Agrawal 2006). Chez les poissons, on dénombre dix-sept TLR (1, 2, 3, 4, 5, 5S, 7, 8, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23), certains étant analogues par rapport aux treize TLR (1-13) des mammifères (Aoki et al. 2008).

**Tableau 6. Principaux TLR chez les poissons et leurs PAMPs associés (Medzhitov and Janeway 2000b; Akira et al. 2006).**

TLR	Type cellulaire	PAMPs associés
TLR1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macrophages</li> <li>• PMN</li> <li>• Mastocytes</li> <li>• DC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triacyl lipopeptide (paroi bactérienne)</li> </ul>
TLR2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macrophages</li> <li>• PMN</li> <li>• Mastocytes</li> <li>• DC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptidoglycan (paroi bactérienne)</li> <li>• Acide lipotchéique (LTA, paroi des bactéries Gram +)</li> <li>• Lipopolysaccharide (membrane externe des bactéries Gram -) <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Prophyromonas gingivitis</i></li> <li>○ <i>Leptospira interrogans</i></li> </ul> </li> <li>• Zymosan (paroi cellulaire des levures)</li> <li>• Lipoarabinomannane (LAM, paroi de <i>Mycobacterium</i>)</li> <li>• Diverses lipoprotéines bactériennes</li> <li>• Autres motifs particuliers <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Un facteur phénolique soluble de <i>Staphylococcus epidermis</i></li> <li>○ Glycosylphosphatidylinositol de <i>Trypanosoma cruzi</i></li> </ul> </li> </ul>
Afin de reconnaître la vaste gamme de motifs cités, le TLR2 s'associe souvent à d'autres TLR (TLR1 par exemple) (Janssens and Beyaert 2003).		
TLR3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macrophages</li> <li>• DC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ARN viral double brin (dsRNA)</li> </ul>
Localisation cytoplasmique (endosome).		
TLR4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Granulocytes</li> <li>• Macrophages</li> <li>• DC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipopolysaccharide bactérien (LPS)</li> <li>• LTA</li> <li>• Protéine de fusion du virus syncytial respiratoire (RSV)</li> <li>• <i>Heat-Shock Protein 60</i> (HSP60)</li> </ul>
Le TLR4 n'a encore été retrouvé que chez certaines espèces de poissons modèles, comme <i>Brachydanio rerio</i> , il ne lierait peut-être pas le LPS (Iliev et al. 2005).		
TLR5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocytes</li> <li>• DC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Région constante D1 de la flagelline (protéine constitutive des flagelles bactériens)</li> </ul> <div data-bbox="829 1590 1181 1881"> <p>The diagram illustrates the structure of a flagellin protein, which is the main component of bacterial flagella. It is a long, thin protein with several distinct regions labeled D0, D1, D2, and D3. D0 is at the base, followed by D1, D2, and D3 at the tip. D1 is highlighted in green, indicating it is the specific region recognized by TLR5. The protein is shown in a 3D ribbon representation.</p> </div> <p><i>Flagellin</i>  (<a href="http://2008.igem.org/wiki/images/0/0f/Ecoli_filament.jpg">http://2008.igem.org/wiki/images/0/0f/Ecoli_filament.jpg</a>)</p>
TLR6	N'a pas été mis en évidence chez les poissons.	



Les TLR (**Tableau 6**) ont pour fonction de reconnaître les PAMPs et d'activer la réponse immunitaire innée. A chaque TLR sont associés un ou plusieurs motifs moléculaires particuliers (**Figure 8**), cette association étant très conservée chez les animaux, tant chez les mammifères que chez les poissons (Janeway and Medzhitov 2002).

9°) Voies d'activation de l'immunité innée

Les TLR, suite à la liaison avec le ligand, déclenchent l'activation de divers facteurs de transcription et kinases de stress (Huet et al. 2004). Ils peuvent aussi réguler positivement ou négativement d'autres TLR, ainsi que d'autres classes de récepteurs : *NLR* (voies de l'inflammation), *CARD* hélicases (senseurs cytoplasmiques à l'ARN viral), *C-lectines* (voies de l'endocytose et de la phagocytose), récepteurs du complément (*C5aR*), ... (Lee and Min 2007).

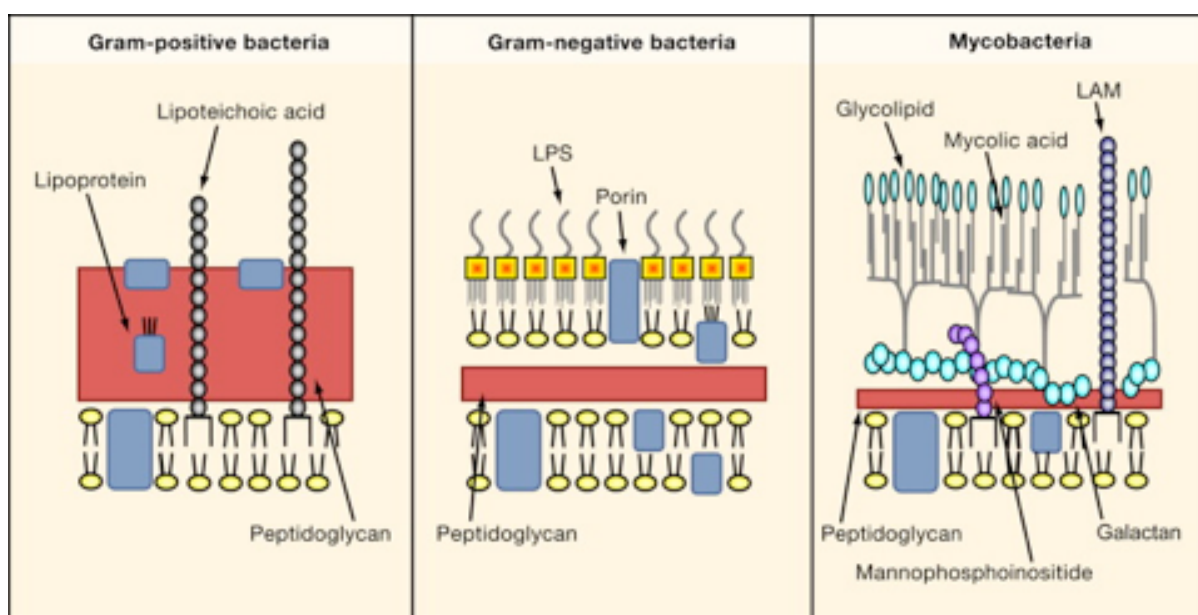
Un des éléments les plus importants dans la voie de signalisation des TLR est le *Myeloid Differentiation factor 88* (*MyD88*). Il se compose d'une extrémité N-terminale, appelée *Death Domain* (*DD*), et d'une extrémité C-terminale de type *TIR* (Kawai and Akira 2005). C'est le *DD* qui est responsable des interactions avec les autres éléments de la voie de transduction du signal. *In fine*, il permet l'activation de facteurs de transcription, comme *NFκB* (*Nuclear Factor κB*), et de diverses kinases, comme *JNK* (*c-Jun N-terminal Kinase*, appelée aussi *Stress-Activated Protein Kinase*, *SAPK*) (Burns et al. 1998).

Il existe deux grandes voies de signalisation TLR/*IL-1*, présentes chez les mammifères et chez les poissons (Aoki et al. 2008) (**Figure 9**) : une faisant intervenir l'adaptateur *MyD88* et aboutissant à l'activation de la famille de facteurs de transcription *Rel/NFκB*, utilisée par tous les TLR sauf le *TLR3* (Janeway and Medzhitov 2002; Huet et al. 2004), et une recrutant l'adaptateur *TRIF* (appelé aussi *TICAM1*, *TIR-domain Containing Adapter Molecule inducing interferon-β*), utilisée par les *TLR 3* et *4* (Yamamoto et al. 2004; Kawai and Akira 2005).

A côté de l'activation des récepteurs, il existe un rétrocontrôle des TLR faisant intervenir trois catégories d'agents inhibiteurs : récepteurs-leurres solubles, régulateurs intracellulaires et régulateurs transmembranaires (Cremer 2009). Ils

**Tableau 6 (suite). Principaux TLR chez les poissons et leurs PAMPs associés (Medzhitov and Janeway 2000b; Akira et al. 2006).**

TLR7 et 8	<ul style="list-style-type: none"> <li>Granulocytes</li> <li>Monocytes</li> <li>DC</li> </ul>	ARN simple brin viral (ssRNA)
Localisation cytoplasmique (endosome).		
TLR9	<ul style="list-style-type: none"> <li>PMN</li> <li>Eosinophiles</li> <li>NK</li> <li>DC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Motifs CpG (régions de la molécule d'ADN particulièrement riches en cytosine et guanine) non méthylés du génome bactérien et viral.</li> <li>Hémozoïne (dipeptide produit par la dégradation de l'hémoglobine en cas d'infection par l'agent de la malaria, <i>Plasmodium</i>)</li> </ul>
Localisation cytoplasmique (endosome).		
TLR10	N'a pas été mis en évidence chez les poissons.	
TLR11		
TLR12		
TLR13		
TLR14	Fonction inconnue	
TLR15	N'a pas été mis en évidence chez les poissons.	
TLR16		
TLR17		
TLR18		
TLR19	Fonction inconnue	
TLR20		
TLR21		
TLR22		
TLR23		



**Figure 8. Représentation schématique de la paroi des trois grands groupes de bactéries (Akira et al. 2006).**

peuvent correspondre soit à des intermédiaires des voies d'activation (Huet et al. 2004), soit à des molécules inhibitrices endogènes ou exogènes (Pandey and Agrawal 2006) (**Tableau 7**).

d. Immunité adaptative

1°) Présentation

L'apparition tardive dans le règne animal de l'immunité adaptative (Vertebrata, - 500 Ma) (Matsunaga and Rahman 1998; Medzhitov and Janeway 2000b) suppose une mécanique d'activation et de reconnaissance des pathogènes complexe. En effet, la reconnaissance des antigènes se fait de manière spécifique et varie en fonction du type et de l'espèce de microorganisme, grâce à des récepteurs produits par réarrangement de segments de gènes (Magnadottir 2006). Suite à cette reconnaissance, des mécanismes de protection se mettent en place (réponses à médiation cellulaire ou humorale), mais une mémoire immunologique est aussi développée via les lymphocytes mémoires (réponse anamnétique) (Watts et al. 2001). Il faut aussi mentionner que cette réponse immunitaire est impliquée dans le développement des allergies, l'auto-immunité et le rejet de greffes.

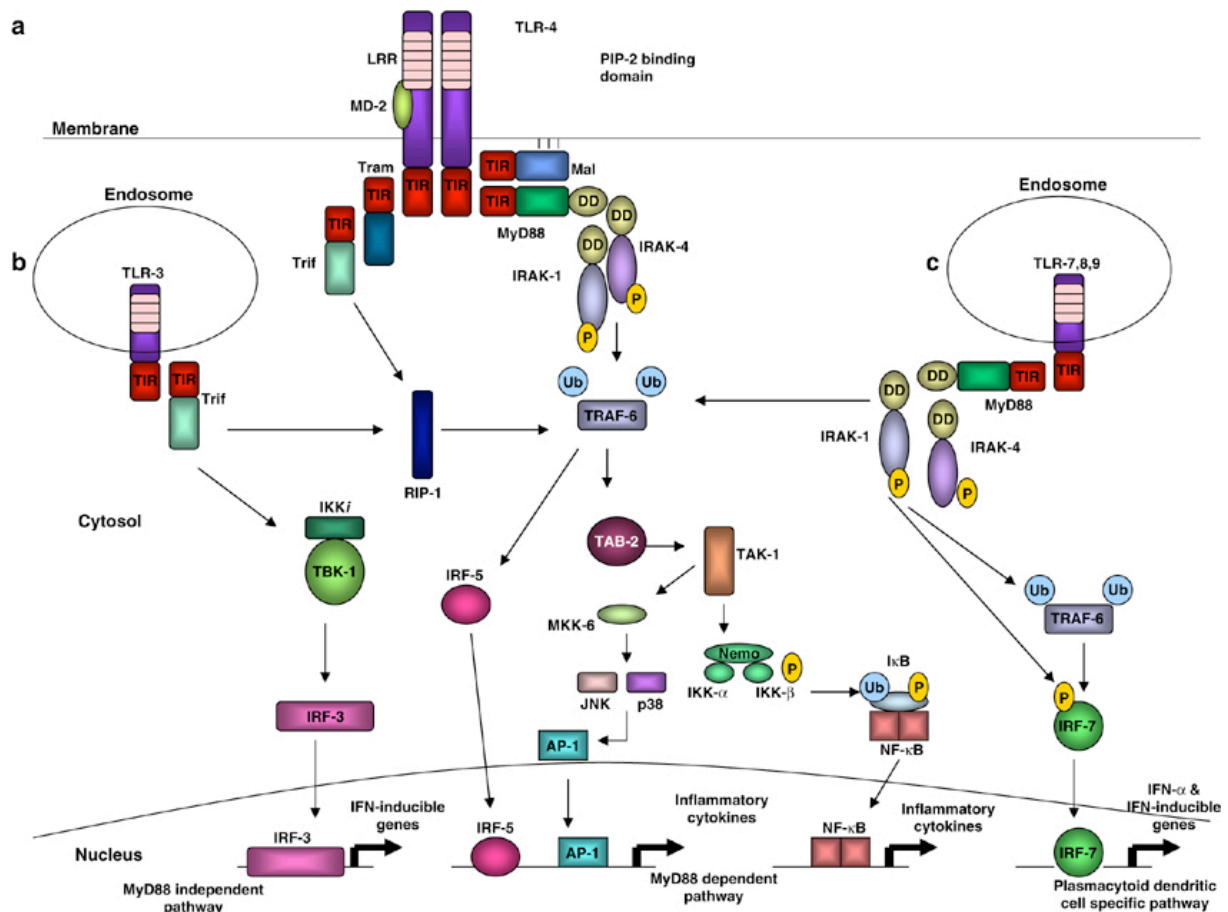
Il est clair que l'apparition tardive de l'immunité adaptative entraîne une réponse moins développée de celle-ci chez les poissons et la prépondérance de la réponse innée (Plouffe et al. 2005).

2°) Mécanismes de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est une immunité dite combinatoire. Celle-ci est définie par des gènes de recombinaison, les *Recombination Activating Genes* (RAG1 et RAG2), des adaptateurs de type complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), des récepteurs recombinés (TCR et BCR) et des immunoglobulines (Ig) (Schluter et al. 1999). Ces éléments sont présents chez tous les vertébrés, à l'exception des Agnatha, qui sont donc dépourvus de ce type de système immunitaire (Matsunaga and Rahman 1998).

3°) Immunité adaptative cellulaire et humorale

L'immunité adaptative est composée d'éléments cellulaires et humoraux (Watts et al. 2001; Tort et al. 2003).



**Figure 9. Voie de signalisation TLR/IL-1** ([www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/Kinsell/figure%252015-04.jpg](http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/Kinsell/figure%252015-04.jpg)).

### Voie MyD88-dépendante

- (1) La fixation du ligand sur le TLR entraîne le recrutement de MyD88 via une interaction TIR-TIR (association des domaines C-terminaux du TLR et de MyD88). MyD88 permet le rapprochement d'IRAK-4 (*IL-1R Associated Kinase*, une sérine-thréonine kinase) du complexe récepteur et la formation du complexe Tollip/IRAK-1 (*Toll Interacting Protein*), permettant à celui-ci de se fixer à MyD88 via son DD. Grâce à l'interaction IRAK-1/IRAK-4, IRAK-4 peut phosphoryler IRAK-1, entraînant son activation. TRAF-6 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor*) va interagir de façon transitoire avec le complexe par l'intermédiaire de la forme activée d'IRAK-1.
- (2) Le complexe phospho-IRAK-1/TRAF-6 se détache du complexe récepteur pour ensuite interagir avec le complexe membranaire constitué par TAK1 (*Transforming Growth Factor β Activated Kinase*), TAB1 et TAB2 (*TAK-Binding Protein*), entraînant leur phosphorylation et leur translocation dans le cytosol. IRAK-1 reste au niveau membranaire où elle va être dégradée.
- (3) Dans le cytosol le complexe multimérique composé par TRAF-6/TAK1/TAB1/TAB2 va interagir avec les ligases ubiquitine Ubc13 et Uev1A, permettant l'ubiquitination de TRAF-6, indispensable à l'activation de TAK-1.
- (4) Une fois activée, TAK-1 phosphoryle le complexe IKK (*Inhibitor of κB Kinase*) et certaines MAP kinase-kinases (MKK) spécifiques. IKK dégrade IκB (*Inhibitor of NFκB*). NFκB, ainsi libéré, migre dans le noyau où il va interagir avec les promoteurs de cytokines proinflammatoires (TNF-α, IL-1, IL-6) et de chémokines (IL-8).

La réponse cellulaire est médiée par les lymphocytes dits conventionnels : LT *helpers* ou mémoires (LT<sub>H</sub> ou LT CD4), LT cytotoxiques (LT CD8) et LB2. Ceux-ci sont activés par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APC) : macrophages, DC, LB et certains épithéliocytes activés.

La réponse humorale consiste en la synthèse d'Ig par les LB. Les LB1 (innés) synthétisent des Ig possédant une large spécificité aux antigènes microbiens communs, contrairement aux LB2, dont les Ig sont hautement spécifiques. Les Ig sont des protéines constituées d'une chaîne lourde (H) et d'une chaîne légère (L), comportant chacune une région constante (Fc) et une région variable (Fv) (**Figure 10**). Chez les poissons, les Ig sont au nombre de quatre (les mammifères en possèdent cinq : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM) : IgM tétramériques (caractérisés par une chaîne lourde H- $\mu$  et présents en plusieurs isotypes), IgD (H- $\delta$ ), IgT (H- $\tau$ ) et IgZ (H- $\zeta$ ). Chez les Chondrichthyens, on retrouve en plus des IgNAR et IgNARC (ou IgW ou IgX) (Alvarez-Pellitero 2008).

#### 4°) Cibles de l'immunité adaptative

Les récepteurs de la réponse adaptative reconnaissent les antigènes présentés par les APC via le système du MHC de classe I (pathogènes intracellulaires, présentés aux LT CD8 cytotoxiques) et de classe II (pathogènes extracellulaires, présentés aux LT CD4 mémoire, qui activeront les LB2) (**Figures 11 et 12**) (Tort et al. 2003).

#### 5°) Récepteurs de l'immunité adaptative

Il existe deux grands types de récepteurs adaptatifs : les *T-Cell Receptors* (TCR) et les *B-Cell Receptors* (BCR) (**Figure 13**) (Miller et al. 1998). Ces récepteurs, assemblés aléatoirement, sont distribués de manière clonale, ce qui permet une sélection cellulaire pathogène-spécifique. C'est ce mécanisme qui est à la base de la mémoire immunologique.

Les TCR sont au nombre de cinq : TCR- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\zeta$ . Ils reconnaissent le MHC présenté par les autres leucocytes. Les TCR des *Innate T-like Cells* (NK et NCC) reconnaissent les antigènes microbiens présentés par le MHC de classe I non classique (Alvarez-Pellitero 2008).

**Figure 9 (suite). Voie de signalisation TLR/IL-1**  
 (www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/Kinsell/figure%252015-04.jpg).

**Voie MyD88-indépendante (TRIF)**

- (1) La fixation du ligand sur le TLR entraîne le recrutement de TRAM (*TRIF-Related Adaptor Molecule*, aussi appelée TICAM2) et de TRIF.
- (2) TRIF interagit ensuite soit avec le complexe IRAK-1/IRAK-4/TRAF-6, et suit de ce fait la voie initiée par MyD88, soit avec RIP-1 (*Receptor Interacting Protein kinase*), soit avec TBK-1 (*TRAF-family member associated NFκB activator-Binding Kinase*).
- (3) RIP-1 va ensuite recruter différentes caspases (*cysteinyI-aspartate-cleaving proteases*), tandis que TBK-1 va activer IKK-ε.
- (4) Les caspases induisent finalement le facteur de transcription NFκB, alors que IKK-ε recrute IRF 3 et 7 (*Interferon Regulatory Factor*), activateurs de l'expression d'interférons de type 1 (IFN α, γ, ...).

**Tableau 7. Agents inhibiteurs de la voie de signalisation des TLR (Cremer 2009).**

<b>Agents inhibiteurs</b>	<b>Modalité d'inhibition</b>
TLR2s TLR4s	Ligands solubles des TLR correspondant, empêchant la fixation des PAMPs
MyD88s	Forme altérée soluble, entrant en compétition avec MyD88 pour le recrutement d'IRAK1/IRAK4
Tollip	Inhibition de la phosphorylation d'IRAK1 par IRAK4 par surexpression
IRAK-M	Augmente l'affinité du complexe MyD88/IRAK1/IRAK4, empêchant la phosphorylation d'IRAK1
IRF-4	Compétiteur d'IRF-3, empêchant l'expression des interférons
A20	Enzyme de modification de l'ubiquitination, inhibant la voie NFκB par déubiquitination de TRAF6
SOCS ( <i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i> )	
SIGIRR ( <i>Single Immunoglobuline IL-1R Related protein</i> )	
Tlp A ( <i>TIR-like Protein A</i> )	Facteur de virulence de <i>Salmonella enterica</i> , présentant des analogies structurales avec les domaines TIR, empêchant la transduction du signal par les TLR

Les BCR sont en fait des Ig membranaires (mIg). Ils reconnaissent les peptides antigéniques portés par les pathogènes (déterminant moléculaire tridimensionnel : l'épitope) (Alvarez-Pellitero 2008).

6°) Immunité innée versus adaptative

Chez les poissons, la réponse adaptative est moins efficace que la réponse innée. Ce phénomène peut s'expliquer par l'absence de maturation de l'affinité (absence de ganglions lymphatiques et de leurs centres de germination), d'hypermutations somatiques et de mécanismes de sélection des lymphocytes B (Matsunaga and Rahman 1998). Ils présentent néanmoins un réarrangement de la chaîne lourde des Ig et l'exclusion allélique (Miller et al. 1998).

7°) Intérêt d'une réponse immunitaire adaptative

L'avantage de l'existence d'un système immunitaire adaptatif est la capacité de se rappeler ou de s'adapter à un agent infectieux (Janeway and Medzhitov 2002), cette mémoire étant confinée à l'individu concerné (pas de transmission via la lignée germinale).

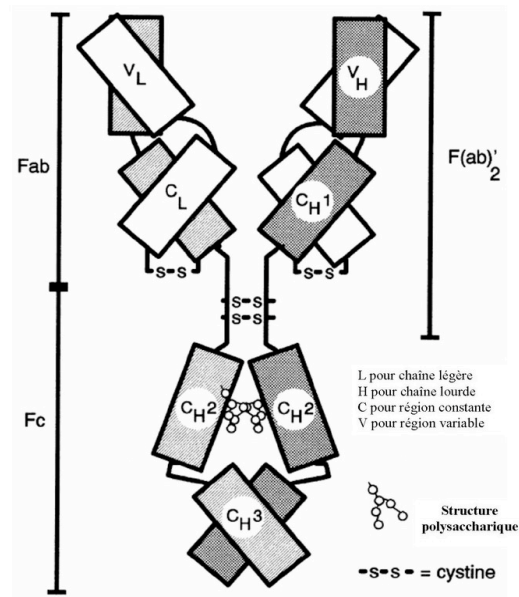
### **3. Immunostimulation**

a. Généralités

1°) Traitement des poissons contre les maladies

En aquaculture, les poissons sont stockés en forte densité dans des espaces fermés restreints (bassins par exemple). Ces conditions créent un environnement favorable au développement de maladies. De manière à lutter efficacement contre ce phénomène, diverses méthodes sont utilisées : chimiothérapies, vaccination et immunostimulation (Sakai 1999; Hoffmann 2007).

- Chimiothérapie : traitement des poissons *a posteriori* (thérapie) par des antibiotiques. Si l'efficacité est excellente, le caractère limitant réside dans le spectre d'activité (moyen), la durée (court terme) et l'acquisition possible de résistance de la part des pathogènes.
- Vaccination : traitement des poissons *a priori* (prophylaxie) par une forme inactive ou atténuée du point de vue virulence du pathogène. L'efficacité est excellente et s'inscrit sur le long terme, mais le spectre d'activité est très



**Figure 10. Domaines structuraux d'une immunoglobuline** ([www.leucemie-espoir.org/IMG/jpg/Doc\\_1-19.jpg](http://www.leucemie-espoir.org/IMG/jpg/Doc_1-19.jpg)).

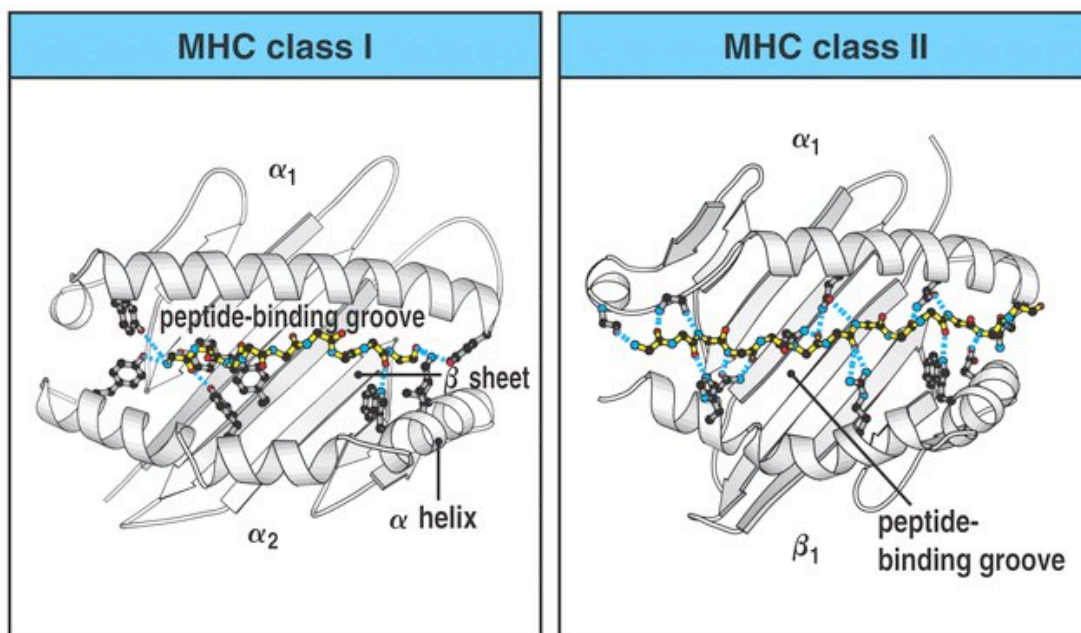


Figure 3-15 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

**Figure 11. Complexe majeur d'histocompatibilité (MHC de classe I et II)** (<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Secure/CaseNoTap/Tcellsynapse.jpg>).



limité (un vaccin correspond à une forme pathogène). De plus, le développement des vaccins est peu aisé et l'injection est un processus relativement fastidieux.

- Immunostimulation : traitement des poissons *a priori* (prophylaxie) par des PAMPs ou d'autres molécules (naturelles ou synthétiques). L'efficacité est bonne (moindre cependant que pour les antibiotiques) et le spectre d'activité est très large, mais cette technique s'inscrit sur le court terme et n'est pas efficace pour tous les pathogènes.

## 2°) Immunostimulation et immunostimulants

Le principe de l'immunostimulation réside dans l'augmentation de l'immunocompétence du système immunitaire inné par mise en contact avec des immunostimulants (Jin 2004), à savoir des motifs moléculaires essentiels à la structure des organismes pathogènes (des PAMPs donc) comme le matériel héréditaire (ADN, ARN), la paroi cellulaire (peptidoglycan, lipopolysaccharide), certaines protéines (flagelline, ...).

L'immunostimulation permet de réduire la mortalité due aux pathogènes, de prévenir les maladies virales, d'augmenter la résistance aux parasites, d'augmenter l'efficacité des antibiotiques et des vaccins, ... (Raa 2000).

## 3°) Catégories d'immunostimulants

Les immunostimulants utilisés en aquaculture appartiennent à plusieurs catégories de molécules (**Tableau 8**) (Sakai 1999; Raa 2000).

## 4°) Voies d'administration

Trois voies d'administration sont utilisées avec les immunostimulants (Sakai 1999).

- Injection dans la cavité péritonéale : méthode efficace mais fastidieuse et impraticable sur des individus de moins de 15 g.
- Administration *per os* (nourriture) : méthode plus facile à mettre en œuvre que la précédente et non stressante, mais dépendante de la taille des individus.
- Immersion (milieu environnant) : méthode non stressante, mais d'une durée limitée (deux semaines).

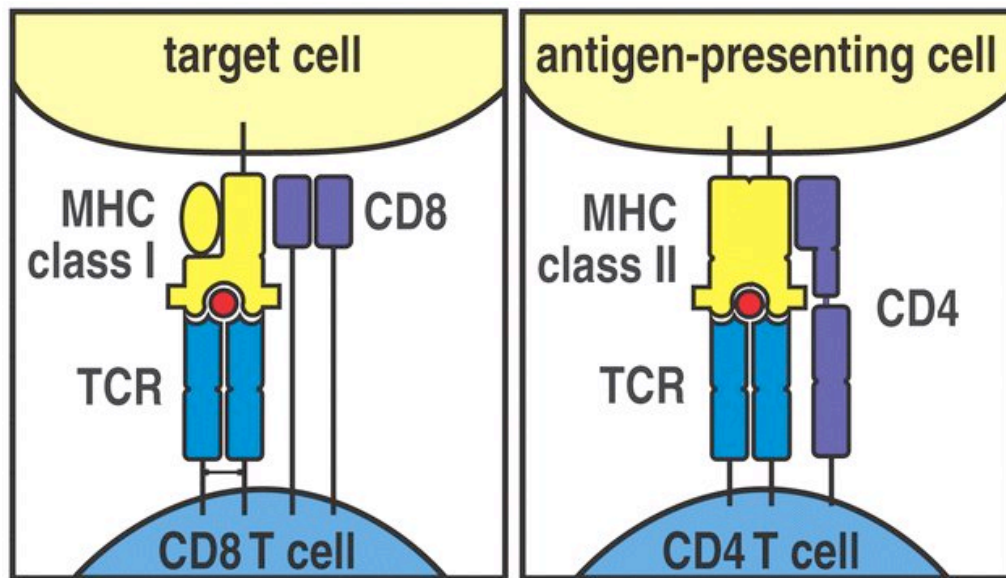
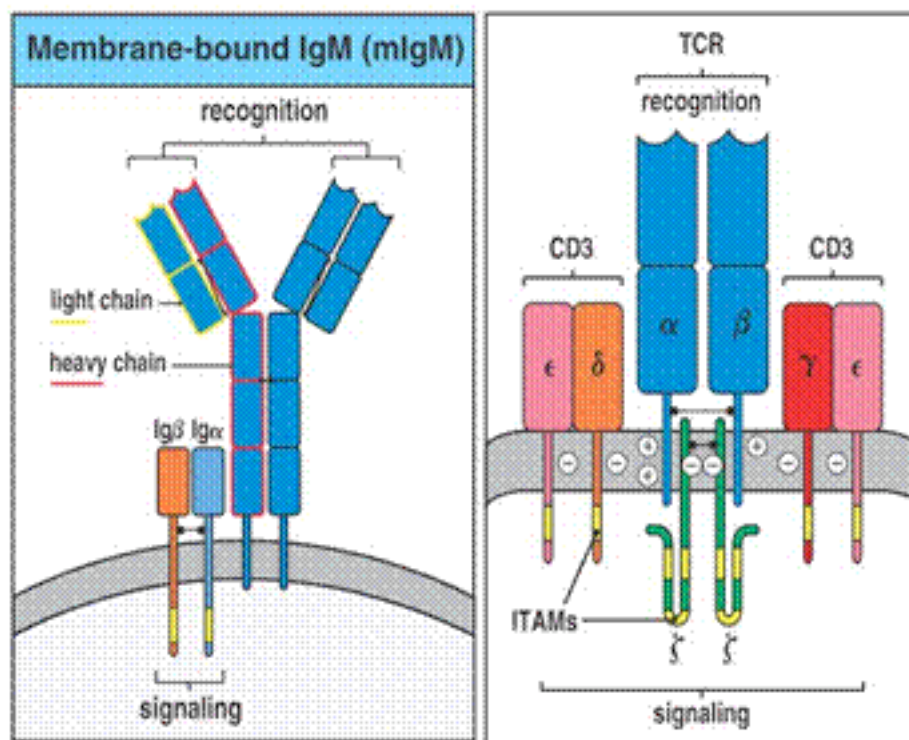


Figure 3-12 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

**Figure 12. Lymphocytes T, marqueurs CD et reconnaissance du MHC**  
 (<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Secure/CaseNoTap/Tcellsynapse.jpg>).



**Figure 13. Lymphocytes et récepteurs TCR/BCR (mIgM)**  
 (<http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2009/02/clip-image00213.gif>).

Il est à noter que l'effet immunostimulant n'est pas dose-dépendant. Par exemple, Robertsen *et al.* (1994) ont montré que l'augmentation de l'activité *respiratory burst* chez des macrophages traités avec des glucans était maximale aux concentrations 0,1 et 1 µg/ml, alors que 10 µg/ml n'ont pas d'effet et que 50 µg/ml inhibent la réaction.

5°) Effet des immunostimulants sur le système immunitaire

Les immunostimulants agissent de manière diverse sur le système immunitaire (Sakai 1999) : augmentation de l'activité phagocytaire des leucocytes (macrophages, PMN, NK) et de l'activité des lymphocytes, augmentation de l'activité du lysozyme, de l'activation du système du complément et de la production d'immunoglobulines. Par exemple, Chen & Ainsworth (1992) ont rapporté une augmentation du titre d'Ig dans le sérum de la barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*) lors d'un challenge-test par *Edwardsiella ictaluri* suite à l'injection de β-glucans de levures.

b. Lipopolysaccharide bactérien

1°) Présentation

Le lipopolysaccharide (LPS), aussi appelé endotoxine, est un composant essentiel de la paroi des bactéries Gram négatif (**Figure 14**) (Prescott et al. 2003). Celles-ci ont une paroi constituée de deux couches. Au-delà du plasmalemme, on retrouve l'espace périplasmique qui contient, entre autre, une monocouche de peptidoglycan (ou muréine), extrêmement mince par rapport aux Gram positif, et de nombreuses protéines (liaison, enzymes hydrolytiques, de détoxification des antibiotiques, ...). Ensuite, vient la membrane externe (*outer membrane*). Celle-ci présente deux feuillets : un interne, en tous points semblable à celui des autres membranes biologiques, et un externe, dont la composition diffère sensiblement. En effet, il ne se compose pas de phospholipides, mais de LPS.

Le LPS est une molécule de 10 kDa de poids moléculaire comportant trois parties distinctes (**Figure 15**).

- Le lipide A (extrémité hydrophobe membranaire) : dimère de β-1,6-glucosamine, sur lequel sont fixées plusieurs molécules d'acides gras à 14

**Tableau 8. Immunostimulants (Sakai 1999; Raa 2000).**

Catégories d'immunostimulants	Molécules
Dérivés viraux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ADN</li> <li>• ARN</li> <li>• Protéines</li> </ul>
Dérivés bactériens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CpG</li> <li>• <math>\beta</math>-glucans</li> <li>• Peptidoglycan</li> <li>• Lipopolysaccharide</li> <li>• Muramyl dipeptide</li> <li>• Bactéries (<i>Clostridium</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., ...)</li> <li>• ...</li> </ul>
Dérivés de levures	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chitine</li> <li>• Chitosan (chitine N-acétylée)</li> <li>• <math>\beta</math>-glucans,</li> <li>• ...</li> </ul>
Extraits de plantes et d'animaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ete (<i>Ecteinascidia turbinata</i>, Urochordata)</li> <li>• Hde (<i>Haliotis discus hannai</i>, Gastropoda)</li> <li>• EF203 (extrait d'œuf de poule)</li> <li>• Glycorrhizine (saponine glycosylée)</li> <li>• ...</li> </ul>
Facteurs nutritionnels	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitamines (A, C, E, ...)</li> </ul>
Hormones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Growth Hormone</i> (GH)</li> <li>• Prolactine (PRL)</li> </ul>
Cytokines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukine</li> <li>• Interférons</li> </ul>
Composés synthétiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levamisole (antihelminthes)</li> <li>• FK-565 (lactoyl térapeptide)</li> <li>• ...</li> </ul>

carbones (acide tétradécanoïque ou myristique). Il est responsable des fonctions biologiques du LPS.

- Le core : ensemble de glucides, dont deux formes particulières que sont l'heptose et l'acide 2-céto-3-désoxyoctonoïque (KDO).
- La chaîne O (extrémité hydrophile extracellulaire, variable) : motif composé de trioses, trétoses ou pentoses (dont plusieurs glucides atypiques : abéquose, tyvulose, colitose, ...), répété de 2 à 40 fois. Elle est responsable de la spécificité sérologique (antigène O).

De même que dans le plasmalemm, des protéines et autres complexes sont enchâssés dans la membrane externe : porines (canaux transmembranaires permettant la diffusion passive de composés hydrophiles), protéines de transport (vitamine B12, polysaccharides, ...), lipoprotéines de liaison avec le peptidoglycan, complexe de Bayer (liaison entre la membrane externe et le plasmalemm), ...

Il est à noter que certaines bactéries Gram<sup>+</sup>, comme *Listeria monocytogenes*, présentent une activité LPS-like (Swain et al. 2008).

## 2°) Reconnaissance du LPS

Chez les mammifères, le LPS est lié par le TLR4 et fait intervenir l'adaptateur TRIF et les motifs accessoires extracellulaires CD14 et LY96 (*Lymphocyte antigen 96*, appelé aussi MD-2). Chez les poissons, jusqu'à présent, on n'a retrouvé ce récepteur que chez *Danio rerio* et le goujon rare (*Gobiocypris rarus*), alors qu'il est absent, ainsi que les autres molécules évoquées, du génome du poisson-globe japonais (*Takifugu rubripes*), du poisson-ballon lisse (*Tetraodon nigroviridis*) et de l'épinoche à 3 épines (*Gasterosteus aculeatus*) (Roach et al. 2005). L'absence de ces éléments expliquerait peut-être la sensibilité moindre des poissons vis-à-vis du LPS, malgré sa capacité d'induction de l'expression de nombreuses cytokines proinflammatoires et APP (Swain et al. 2008).

D'autres récepteurs interviendraient donc dans la liaison du LPS : les  $\beta$ -2 intégrines (CD11 et CD18), le TLR2 (LPS de certaines bactéries), le TLR23 chez *T. rubripes*, ... Les  $\beta$ -2 intégrines seraient des éléments clés, notamment en raison

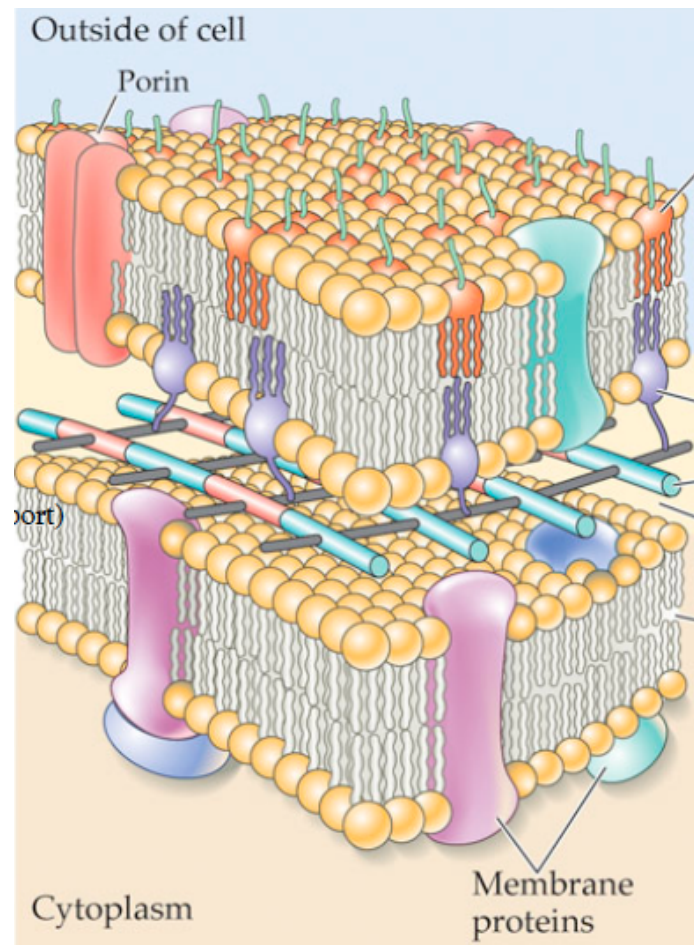


Figure 14. Paroi cellulaire des bactéries Gram - (Prescott et al. 2003).

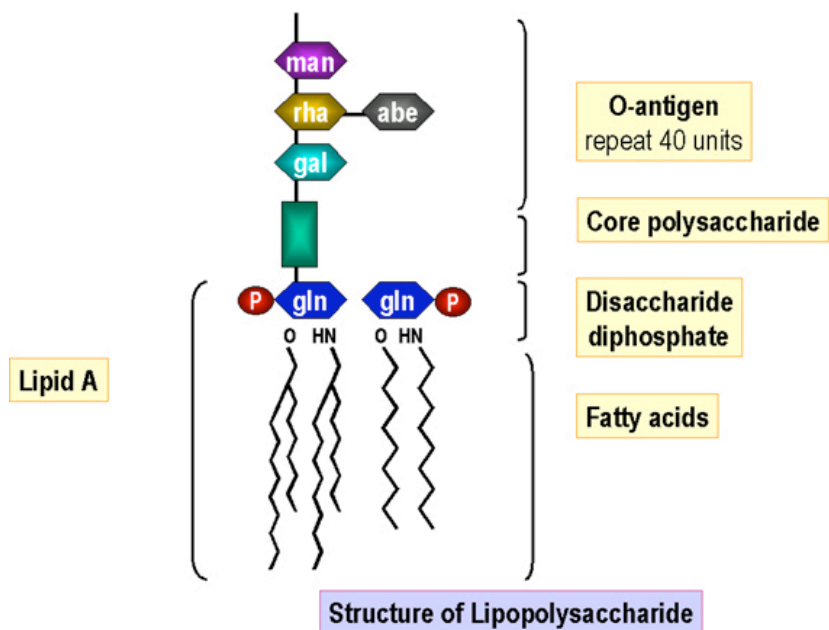


Figure 15. Structure du lipopolysaccharide bactérien  
([www.gch.ulaval.ca/agarnier/GCH66295/microorganismes/lps.jpg](http://www.gch.ulaval.ca/agarnier/GCH66295/microorganismes/lps.jpg)).

de leur capacité à reconnaître le lipide A et d'induire un signal cytoplasmique via les MAP kinases et NfκB (Iliev et al. 2005).

### 3°) Effets pathologiques du LPS

Le LPS est le principal facteur de virulence des bactéries Gram<sup>-</sup>.

Le LPS déclenche des réponses inflammatoires sévères, résultant en hypotension, coagulation intravasculaire, hypoferrémie, leucocytose, leucopénie, neutropénie, glycogénolyse hépatique, pyrogénicité, sepsis et avortement (Nayak et al. 2008). Les réponses induites sont de types physiologiques (diminution de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la biogenèse mitochondriale), immunologiques, endocriniens et neuroendocriniens, comme par exemple, la modification de l'axe Hypothalamus-Hypophyse-Interrénales (HPI) par inhibition de la production de l'*Adrenocorticotrophic Hormone* (ACTH) ou de l'*α-Melanocyte Stimulating Hormone* (α-MSH) (Swain et al. 2008).

### 4°) Immunostimulation

Le LPS peut être utilisé comme immunostimulant, avec les effets suivants (**Tableau 9**) (Sakai 1999; Swain et al. 2008) :

- Activation du lysozyme et du complément (voie alternative).
- Augmentation de l'activité migratoire et phagocytaire des macrophages.
- Activation de l'activité *respiratory burst* des macrophages.
- Production de cytokines proinflammatoires (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α) et d'anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par les macrophages.
- Production de *Macrophage Activating Factor* (MAF) par les lymphocytes.
- Stimulation de la prolifération de lymphocytes B.
- Production d'anticorps anti-O (réponse T-indépendante).
- Production de cortisol et de prostaglandines.

De nombreuses études ont rapporté une augmentation de la résistance de plusieurs espèces de poissons à certaines bactéries. Par exemple, Huttenhuis *et al.* (2006) ont montré que, chez de jeunes *Cyprinus carpio* infectés par *Vibrio anguillarum*, les individus nourris avec du LPS d'*Aeromonas salmonic*a avaient un taux de mortalité similaire à celui des contrôles, mais étaient proportionnellement plus grands et plus gros que ces derniers.

**Tableau 9. Effets du LPS chez différentes espèces de poissons (Swain et al. 2008).**

Sl. No	Fish	LPS/Source	Mode of administration	Effects/Activity
1	<i>D. rerio</i>	<i>E. coli</i>	Immersion	Enhances the production of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$
2	<i>L. rohita</i>	<i>E. coli</i>	Intraperitoneal @ 1 EU fish <sup>-1</sup>	Increases lysozyme, total globulin level, myeloperoxidase and respiratory burst activities
	<i>L. rohita</i>	<i>E. coli</i>	Intraperitoneal @ 10 EU fish <sup>-1</sup>	Decreases lysozyme, total globulin level, myeloperoxidase and respiratory burst activities
3	<i>P. flavescens</i>	LPS	Intraperitoneal @ 3 mg kg <sup>-1</sup> body weight	Increases cortisol level
4	<i>G. morhua</i>	<i>A. salmonicida</i>	Bath/Feed treatment	Increases survivability
5	<i>C. carpio</i>	LPS	Immunization @ LPS 50/1250 $\mu$ g fish <sup>-1</sup>	Increases phagocytic activity, phagocytic index of macrophages and Ig level
6	<i>S. salar</i>	LPS	Injection	Decreases heart rate after 4 days
7	<i>S. salar</i>	LPS	Bath (0.25% LPS + 1% glucan)	Increases lysozyme of head kidney, intestine, macrophages and polymorphonuclear cells
8	<i>O. mossambicus</i>	<i>E. coli</i> (0111:B4)	<i>In vivo</i>	Increases plasma free fatty acid, cortisol level
9	<i>O. mossambicus</i>	<i>E. coli</i> (0111:B4)	<i>In vivo</i>	Releases adrenocorticotrophic hormone, $\alpha$ -MSH
10	<i>O. mossambicus</i>	<i>E. coli</i>	Injection	Increases CRH and $\alpha$ -MSH content. No change in cortisol level
11	<i>C. carpio</i>	10 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> LPS + 100 $\mu$ g $\beta$ -glucan 0.25% LPS + 1% glucan 100 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> LPS + 1000 $\mu$ g $\beta$ -glucan LPS (10 $\mu$ g) + $\beta$ -glucan (100 $\mu$ g)	Intraperitoneal Oral Bath Intraperitoneal	Increases neutrophils, monocytes count No change in relative percentage of survival No change in relative percentage of survival 100% relative percentage of survival
12	<i>S. aurata</i>	<i>E. coli</i>	Bath	Increases anti protease activity containing protease inhibitors $\alpha$ 1 and 2, anti-plasmin, $\alpha$ 2 macroglobulin. Enhances protection against <i>Photobacterium damsela</i>
13	<i>S. salar</i>	<i>A. salmonicida</i>	Immunization	Enhances specific antibody level
14	<i>O. mykiss</i>	<i>A. salmonicida</i>	Intraperitoneal @ 50 $\mu$ g fish <sup>-1</sup>	Increases antibody titre which persists up to 2–4 weeks
		<i>A. salmonicida</i> + Liposome	Intraperitoneal @ 50 $\mu$ g fish <sup>-1</sup>	Increases antibody titre which persists up to 6–14 weeks
15	<i>S. salar</i>	LPS	<i>In vivo</i>	Enhances phagocytosis, pinocytic activity, production of intracellular superoxidase anion
16	<i>O. mykiss</i>	LPS	<i>In vivo</i>	Induces hypoferremic responses
17	<i>C. carpio</i>	<i>A. hydrophila</i>	Dip immunization	Enhances survivability. No specific antibody level
18	<i>O. mykiss</i>	<i>A. salmonicida/E. coli</i> (055 B5)	Intravascular @ 25 mg kg <sup>-1</sup>	Elevates cortisol level



Signalons l'existence d'effets secondaires à une immunostimulation par le LPS : réduction de l'appétit et suppression de la croissance (Raa 2000).

## II. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

### 1. Problématique des antibiotiques et des maladies

#### a. Maladies

##### 1°) Maladie chez les poissons d'aquaculture

En aquaculture, *P. hypophthalmus* peut être sujet à de nombreuses maladies, causées notamment par les genres *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Myxobolus*, *Sphaerospora*, ... Dans les sections suivantes, nous ne nous intéresserons qu'à *Edwardsiella ictaluri*, maladie nouvellement découverte chez *P. hypophthalmus* (Ferguson et al. 2001; Crumlish et al. 2002). Il est à noter que cette bactérie n'infecte pas *P. bocourti*.

##### 2°) *Edwardsiella ictaluri*

- Biologie

*E. ictaluri* est une bactérie Gram– (bacille) de la famille des Enterobacteriaceae. Elle mesure de 2 à 3 µm de long pour 1 µm de diamètre et est pourvue d'une ciliature pérित्रique (flagelles recouvrant toute la surface de la bactérie). Elle est mobile à 25°C (température de croissance optimale) et immobile à 37°C. Etant aéro-anaérobie, elle synthétise la catalase et la nitrate réductase, mais pas d'oxydases. La fermentation du glucose se fait avec (25°C) ou sans (37°C) production de gaz (Euzéby et al. 2008).

- Pathologie

La première forme d'infection rapportée de *P. hypophthalmus* par *E. ictaluri* date de 2001 (Ferguson et al. 2001). L'edwardsielliose (nécrose bacillaire) est une maladie provoquant un taux de mortalité élevé chez les poissons-chats. Elle est caractérisée par une entérosepticémie (*Enteric Septicaemia of Catfish*, ESC), conduisant à des lésions hémorragiques et nécrotiques (taches blanches irrégulières et multifocales) de la peau et des tissus des viscères abdominaux (principalement le foie, la rate et les reins) (Ho et al. Undated). Ces lésions sont dues à la synthèse de chondroïtinase (enzyme dégradant la chondroïtine du cartilage) et d'hémolysine (Ferguson et al. 2001).

Chez *E. ictaluri*, 60 antigènes O (chaîne O du LPS) et 45 antigènes H (flagelline) ont été identifiés. Il est à noter que le LPS d'*E. ictaluri* permet la résistance aux éléments bactéricides du sérum et à la lyse par le système du complément.

- Symptômes

Suite à une infection par *E. ictaluri*, les poissons présentent les symptômes suivants : perte d'appétit et de pigmentation, diminution de l'activité de nage, exophthalmie, hémorragie anale et nécrose de la peau (Ho et al. Undated).

- Thérapie et prophylaxie

Des essais de thérapie ont montré que le traitement des poissons par des antibiotiques n'avait que peu de résultats (peu de variation dans les taux de mortalité) (Crumlish et al. 2002). Il apparaît donc nécessaire d'utiliser d'autres techniques prophylactiques, comme l'immunostimulation.

b. Antibiotiques et résistance aux antibiotiques

- Antibiotiques

Les agents antimicrobiens, communément appelés antibiotiques, jouent un rôle important dans la promotion de la santé humaine, soit par contrôle des maladies humaines, soit par contrôle des maladies animales pouvant être transmises à l'homme par ingestion d'aliments contaminés. En plus de leur rôle chez les humains, les antibiotiques participent à la promotion du bien-être animal (Smith 2008). Cependant, une mauvaise utilisation (non respect des concentrations, usage abusif) peut entraîner l'apparition d'un phénomène de résistance de la part des pathogènes.

- Résistance aux antibiotiques

L'émergence de résistance bactérienne aux antibiotiques est le principal point négatif de l'utilisation de ces agents.

Les risques pour la santé humaine sont de deux types : sélection de souches résistantes responsables d'infections humaines, et transfert horizontal de gènes vers des espèces colonisant le milieu terrestre. Deux grands types de bactéries sont concernés (santé humaine) : *Salmonella* et *Vibrio* (*V. cholerae* et *V.*

*parahaemolyticus*), responsables, respectivement, de la salmonellose, du choléra et de la gastroentérite (Smith 2008).

L'impact environnemental du développement de résistance est la création de foyers d'infections et de réservoirs de gènes de résistance, pouvant toucher un grand nombre d'organismes vivants.

- Utilisation d'antibiotiques dans l'aquaculture du pangasius

La production de pangasius est accompagnée d'une utilisation importante (700 g/T de poissons au Vietnam) et souvent inappropriée d'antibiotiques, avec les conséquences que nous avons déjà évoquées plus haut (Corsin 2008).

## **2. Objectifs**

Cette étude sur l'immunostimulation de *P. hypophthalmus* comporte trois objectifs.

- 1°) Evaluer jusqu'à quel point les immunostimulants peuvent améliorer la réponse immunitaire chez *P. hypophthalmus* et réguler l'expression des TLR.
- 2°) Vérifier si les immunostimulants peuvent protéger *P. hypophthalmus* contre les pathogènes.
- 3°) Evaluer la durée effective de cette protection.

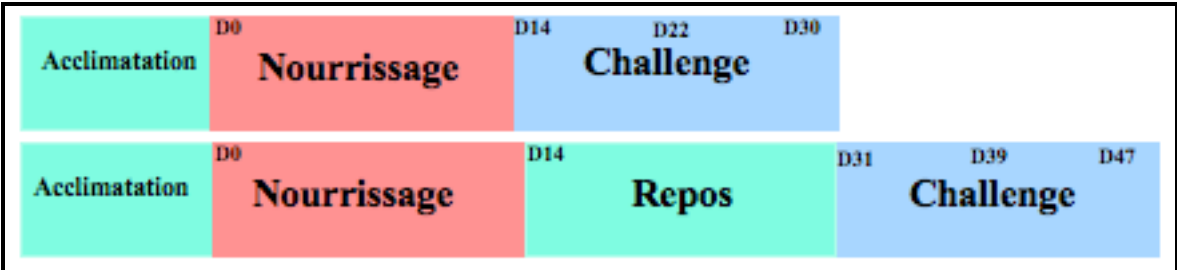


Figure 16. Protocole expérimental.

### III. MATERIEL ET METHODES

Cette section présente l'ensemble du matériel utilisé et les différentes méthodes mises en œuvre pour la réalisation de l'expérience.

#### 1. Protocole expérimental

Les poissons, répartis en 24 bassins, ont été soumis à 3 conditions expérimentales (chacune en duplicat). Ils ont d'abord été traités au LPS (1), puis nous avons appliqué ou non une période de « repos » pour tester les effets à long terme de l'immunostimulation (2), et enfin un challenge test a été réalisé pour évaluer l'efficacité de l'immunostimulation (3) (*Figure 16*).

#### 2. Elevage et échantillonnage

Les parties « élevage » et « échantillonnage » de cette expérience ont été réalisées au Collège d'Aquaculture et des Pêcheries (CAF) de l'Université de Can Tho (Can Tho, Vietnam).

##### a. Poissons

Les poissons utilisés sont des pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) juvéniles de 2 mois, mesurant entre 10 et 20 cm de long, et pesant entre 15 et 25 g. Ils proviennent de l'élevage d'une ferme commerciale du delta du Mékong.

##### b. Elevage

###### 1°) Acclimatation

La partie « élevage » commence par une semaine d'acclimatation dans un grand bassin de 1000 L. A la fin de celle-ci, les poissons sont transférés dans des bassins plus petits de 250 L, à raison de 30 poissons par bassin. L'expérience utilise 24 bassins.

###### 2°) Préparation de la nourriture pour poissons et nourrissage

Une fois transférés, les poissons sont nourris pendant deux semaines avec des granulés fabriqués par le laboratoire du CAF (première condition expérimentale). Chaque groupe de 8 bassins reçoit 0 (poissons-contrôles LPS), 0,5 ou 5 mg LPS/kg poisson/jour (poissons-tests LPS), c'est-à-dire respectivement 0, 34 ou 344

***Tableau 10. Composition de la nourriture pour poissons.***

Type d'aliment		Nourriture de base	Riz	Farine	Huile	Vitamines	Gélatine	Total
Quantité	g	1145,78	482,51	490,06	43,7	40	40	2242,05
	%	51,1	21,5	21,9	1,9	1,8	1,8	100

mg LPS/kg nourriture en considérant un apport quotidien d'aliment représentant 1,5 % de la biomasse.

La nourriture donnée aux poissons se compose d'une formule de base à laquelle sont ajoutés divers compléments, ainsi que la quantité précédemment calculée de LPS (**Tableau 10**). Le tout est mélangé et malaxé jusqu'à obtenir une pâte collante, qui sera ensuite débitée en spaghetti, ceux-ci étant coupés en granulés et mis à sécher pendant une nuit à 65°C. La nourriture est ensuite stockée au frigo.

Par la suite, chaque groupe de 8 bassins (octoplicat) sera divisé en 2 (doubles duplicats) suite à l'ajout d'une deuxième condition expérimentale : présence ou absence d'une période de repos. Cette période correspond à un arrêt de nourrissage au LPS (repos = arrêt de la stimulation du système immunitaire). Les poissons sont donc nourris avec des granulés normaux pendant deux semaines.

### 3°) Challenge test et préparation de la solution bactérienne

La période de nourrissage ou de repos est suivie d'un challenge test mené de manière identique dans les deux cas (troisième condition expérimentale). Un des deux duplicats (poissons-tests injection) est injecté avec une bactérie présélectionnée, *Edwardsiella ictaluri* (pathogène typique de *P. hypophthalmus*), à raison de 0,1 mL de solution bactérienne à une concentration de  $10^4$  bactéries/mL NaCl ( $5 \cdot 10^4$  bactéries/kg poisson). L'autre duplicat (poissons-contrôles injection) est injecté avec une solution saline de NaCl, à raison de 0,1 mL NaCl/poisson.

La solution bactérienne est préparée à partir de bactéries mises préalablement en culture dans du milieu liquide. Les bactéries sont récupérées et centrifugées pendant 15 minutes à 4000 g. Le surnageant est éliminé et le culot nettoyé deux fois à l'éthanol. Il est ensuite redilué dans du NaCl.

La dose retenue correspond à la LD50 (dose létale engendrant 50 % de mortalité après 2 semaines), déterminée grâce à une injection différentielle sur un échantillon de 10 poissons/dose ( $0$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  bactéries/poisson). La détermination de la LD50 a été prise en charge par le laboratoire du CAF.



c. Echantillonnage et prélèvements

1°) Périodes d'échantillonnage

Trois journées d'échantillonnage sont réalisées, d'une part pour les bassins « absence de période de repos », et d'autre part pour les bassins « présence d'une période de repos ». Le premier échantillonnage (T0) se déroule la veille du challenge test, soit directement après la période de nourrissage (2 semaines d'élevage en petit bassin), soit après la période de repos (1 mois d'élevage en petit bassin). Trois poissons/bassin sont prélevés, c'est-à-dire 12 poissons contrôles LPS, 12 poissons test LPS(0,5) et 12 poissons tests LPS(5). Les deuxième (T1) et troisième (T2) échantillonnages se déroulent respectivement après une et deux semaines de challenge. Cinq poissons/bassin sont prélevés, c'est-à-dire 10 poissons-contrôles injection et 10 poissons-tests injection pour les 3 concentrations de LPS, c'est-à-dire 20 poissons-contrôles LPS, 20 poissons-test LPS(0,5) et 20 poissons-tests LPS(5).

2°) Prélèvements

Sur chaque poisson, le sang, le foie et la rate sont prélevés.

- Prélèvement de sang

Le prélèvement sanguin s'effectue à l'aide de seringues 1 mL et d'aiguilles 25 G. L'aiguille est insérée à l'arrière de la nageoire anale, perpendiculairement à la musculature ventrale, jusqu'à la colonne vertébrale. C'est juste en dessous de cette dernière que se trouve la veine caudale. Le sang récolté et conservé sur glace est directement centrifugé (10 minutes à 10000 rpm) et le plasma stocké dans des tubes eppendorfs au congélateur (-60°C ou -80°C).

- Prélèvement d'organe

Le foie et la rate sont prélevés une fois le poisson euthanasié par dislocation cervicale. Le foie est conservé entier, alors que la rate est coupée en deux en vue des dosages ultérieurs. Les organes conservés sur glace sont ensuite stockés dans des tubes eppendorfs au congélateur (-60°C ou -80°C).

### **3. Mesure de la réponse au stress**

Les dosages du cortisol et du glucose ont été réalisés au CAF. Ceux du lysozyme et des immunoglobulines ont été réalisés à l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, (Namur, Belgique) (FUNDP). Pour chaque dosage, excepté celui du lysozyme dans le plasma, le plasma et la rate sont poolés par bassin, et chaque pool est dosé en duplicat.

#### **a. Cortisol**

- Principe

Le dosage du cortisol plasmatique se réalise grâce au kit DRG Cortisol ELISA. Ce kit est basé sur une réaction immuno-enzymatique compétitive. Les microplaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule de cortisol. Le cortisol endogène de l'échantillon entre en compétition avec le conjugué à la HRP pour la liaison à l'anticorps. Après incubation, le conjugué non lié est éliminé durant le lavage des puits. La quantité de peroxydase liée est inversement proportionnelle à la concentration de cortisol contenue dans l'échantillon.

- Méthode

Le dosage est réalisé par rapport à une courbe standard de cortisol (de 0 à 800 ng/mL). 20 µL de standard ou d'échantillons et 200 µL d'enzyme conjuguée sont déposés dans les puits, avant une incubation d'une heure à température ambiante. Les puits sont ensuite vidés et rincés 3 fois avec 400 µL de solution de rinçage. 100 µL de solution substrat sont ajoutés à chaque puit, avant une incubation de 15 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée grâce à l'ajout de 100 µL de solution stop. Finalement, la DO est lue à 450 nm.

- Calcul

La concentration en cortisol (ng/mL) est intrapolée grâce à la valeur de DO et à la courbe standard.

#### **b. Glucose**

- Principe

Le dosage du glucose plasmatique se déroule en deux temps et fait intervenir deux enzymes : la glucose oxydase (GOD) et une peroxydase (POD). La

première réaction consiste en une réaction d'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en D-glucono-1,4-lactone (puis en D-gluconate). Cette réaction, par réduction du dioxygène ( $O_2$ ) libère de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ). La deuxième réaction, à caractère colorimétrique, implique l'oxydation d'un chromogène réduit, le 2,2'-azino-di-(3-éthyl-benzthiazolin-sulfonate (ABTS), par l' $H_2O_2$ . C'est ce changement de coloration qui est mesuré (par spectrophotométrie), la production de chromogène étant directement proportionnelle à la quantité de glucose impliquée dans la réaction.

- Méthode

Le dosage est réalisé par rapport à une courbe standard de glucose (de 0 à 100 mg/mL de tampon phosphate  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$  0,1 M). La première étape consiste en une déprotéinisation : on ajoute à 25  $\mu$ L d'échantillon 50  $\mu$ L d'acide perchlorique ( $HClO_4$ ), et on centrifuge (10 minutes à 3000 rpm). La deuxième étape consiste à faire réagir 25  $\mu$ L de surnageant de déprotéinisation avec 2 mL de solution réactionnelle (29,4 mg GOD, 4 mg POD, 250 mg ABTS dans 1 L de tampon phosphate  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$  0,1 M). Le mélange réactionnel est placé dans un bain-marie à 38°C pendant 15 minutes. Finalement, la densité optique (DO) est lue à 436 nm.

- Calcul

La concentration en glucose (mg/mL) est intrapolée grâce à la valeur de DO et à la courbe standard.

#### 4. Mesure de la réponse immunitaire

##### a. Lysozyme

- Principe

Le dosage du lysozyme se réalise grâce à une mesure du taux de dégradation de la bactérie Gram+ *Micrococcus luteus*. Cette méthode turbidimétrique est basée sur le fait que l'absorbance (DO) est une fonction linéaire de la concentration de *M. luteus*.

**Tableau 11. Dosage du lysozyme dans le plasma et dans la rate.**

Plasma	Rate
<ul style="list-style-type: none"> <li>Standard : 20 µL standard + 130 µL <i>M. luteus</i>.</li> <li>Echantillons : 10 µL échantillon + 10 µL tampon + 130 µL <i>M. luteus</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Broyer 10 mg de rate dans 30 µL de tampon phosphate (100 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 µL triton X-100, 99 mL éthanol 95 %, 1 mL acide acétique).</li> <li>Centrifuger à 10 000 g pendant 5 minutes.</li> <li>Standard : 10 µL standard + 130 µL <i>M. luteus</i>.</li> <li>Echantillons : 2 µL échantillon + 8 µL tampon + 130 µL <i>M. luteus</i>.</li> </ul>

- Méthode

Le dosage est réalisé grâce à une courbe standard de lysozyme de blanc d'œuf (de 100 à 450 u/mL de tampon phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05 M). Le standard et les échantillons sont disposés dans une microplaque à fond plat, auxquels on ajoute du tampon si nécessaire et la solution de *M. luteus* (0,6 mg bactérie/mL tampon). Les volumes varient entre le dosage dans le plasma et celui dans la rate (**Tableau II**). Pour ce dernier, il est en plus nécessaire d'obtenir un homogénat avant le dosage proprement dit. Finalement, la DO est lue à 450 nm après 0 et 40 minutes pour le plasma et après 0 et 180 minutes pour la rate.

- Calcul

Le calcul est basé sur la différence d'absorbance entre le temps initial et le temps final. La concentration en lysozyme (u/mL) est intrapolée grâce à la valeur de DO et à la courbe standard.

b. Immunoglobulines

- Principe

Le dosage des Ig plasmatiques est basé sur une méthode de calcul différentiel. Il s'agit en effet de soustraire de la quantité de protéines totales la quantité de protéines du surnageant de centrifugation (ensemble des petites protéines), sachant que les Ig constituent la majeure partie des protéines du culot (ensemble des grosses protéines ayant précipité à cause du polyéthylène glycol).

- Méthode

Le dosage est réalisé grâce à une courbe standard de sérum d'albumine bovine (de 2 à 20 mg/mL  $\text{H}_2\text{O}$ ). La première étape consiste en la mesure de la quantité de protéines totales. Cinq  $\mu\text{L}$  d'échantillon dilués 10 fois dans de l'eau sont placés dans une cuvette, dans laquelle on ajoute 1 mL de solution Bradford. La DO est mesurée à 595 nm. La deuxième étape consiste en la mesure de la quantité de protéines du surnageant de centrifugation. Vingt-cinq  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 25  $\mu\text{L}$  de polyéthylène glycol 12 % (précipitation) sont d'abord mis à incuber dans des tubes eppendorfs pendant 2 heures à température ambiante, puis centrifugés 10 minutes à 1000 g. Le surnageant est récupéré, dilué

10 fois dans de l'eau et placé dans une cuvette, dans laquelle on ajoute 1 mL de solution Bradford. La DO est mesurée à 595 nm.

- Calcul

Le calcul est basé sur la différence d'absorbance entre la quantité de protéines totales et la quantité de protéines du surnageant de centrifugation. La concentration en Ig (mg/mL) est intrapolée grâce à la valeur de DO et à la courbe standard.

c. Complément et NBT

Il avait aussi été prévu de réaliser les dosages du complément et du Nitro Blue Tétrazolium (NBT). Concernant le complément, le protocole n'a pas pu être mis au point pour pangasius. Et en ce qui concerne le NBT, des problèmes logistiques n'ont pas permis la réalisation de la manipulation sur les rates fraîchement prélevées.

## 5. Mesure de la régulation de l'expression des TLR et des molécules auxiliaires

La mesure de la régulation de l'expression des TLR et des molécules auxiliaires a été réalisée aux FUNDP. Pour chaque dosage de l'expression, le foie et la rate sont poolés par bassin après extraction de l'ARN, et chaque pool est dosé en duplicat.

La méthode de mesure de l'expression d'un gène consiste en une *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR quantitative ou Q-PCR). Le principe général de la Q-PCR est basé sur la détection et la quantification de la fluorescence (soit d'un agent intercalant se liant à l'ADN, soit d'une sonde), dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (Poitras and Houde 2002).

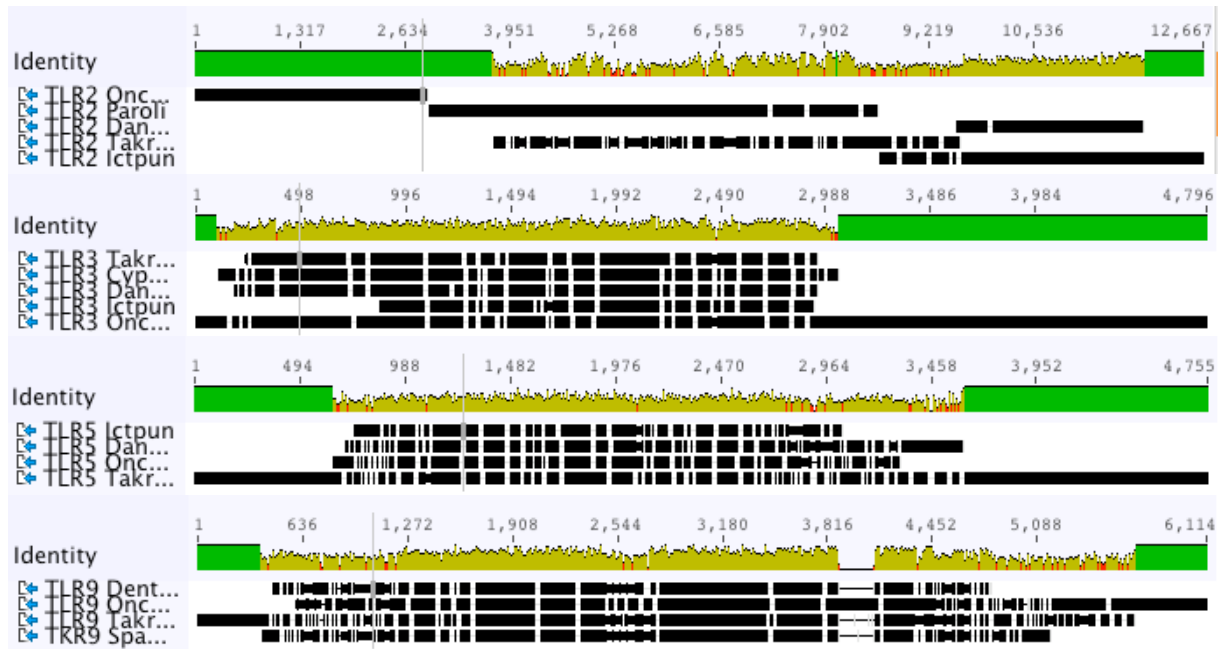
Cette méthode ne peut s'appliquer directement à partir du matériel biologique en notre possession. Toute une série de manipulations expérimentales doit être réalisée au préalable.

a. Sélection des gènes d'intérêts

Notre étude porte sur les *Toll-like Receptors* (TLR). Il a donc été décidé de mesurer l'expression des TLR2, 3, 5 et 9, ainsi que de l'adaptateur MyD88, du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et de la cytokine proinflammatoire TNF $\alpha$ . Une étape préalable à la mesure de l'expression de ces gènes chez *P. hypophthalmus* est leur clonage, étant

**Tableau 12. Recherche de séquences des gènes d'intérêts dans NCBI.**

Gènes	Espèces
TLR2	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (AJ628348), <i>Paralichthys olivaceus</i> (BAD01044), <i>Takifugu rubripes</i> (AAW69370), <i>Ictalurus punctatus</i> (ABD17347), <i>Danio rerio</i> (NP997977)
TLR3	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (AAX68425), <i>Takifugu rubripes</i> (AAW69373), <i>Ictalurus punctatus</i> (ABD93872), <i>Danio rerio</i> (NP001013287), <i>Cyprinus carpio</i> (ABL11473)
TLR5	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (BAC65467), <i>Takifugu rubripes</i> (AAW69374), <i>Ictalurus punctatus</i> (ABF74618), <i>Danio rerio</i> (NP001124067)
TLR9	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (NP001123463), <i>Sparus aurata</i> (AAW81699), <i>Dentex tumifrons</i> (EU256335), <i>Takifugu rubripes</i> (AAW69377)
MyD88	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (NM01124421), <i>Salmo salar</i> (EF672332), <i>Larimichthys crocea</i> (EU978950), <i>Takifugu rubripes</i> (NM001113195), <i>Ictalurus punctatus</i> (EU708325), <i>Danio rerio</i> (AAH83419)
NF-κB	<i>Salmo salar</i> (BT058984), <i>Siniperca chuatsi</i> (EF492047), <i>Danio rerio</i> (XM001339451)
TNFα	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> (AY335443), <i>Dicentrarchus labrax</i> (DQ200910), <i>Epinephelus awoara</i> (AY667275), <i>Lateolabrax japonicus</i> (AY376595), <i>Pagrus major</i> (AY314010), <i>Pseudosciaena crocea</i> (EF070393), <i>Thunnus orientalis</i> (AB354733)



**Figure 17. Alignement multiple et design de primers dégénérés.**

donné qu'ils n'ont pas encore été séquencés et qu'il n'y a aucune donnée relative à cette espèce dans les bases de données.

b. Obtention des primers des gènes d'intérêts

1°) Design de primers dégénérés

- Principe

Un primer dégénéré est un mélange de primers de séquence similaire, mais présentant des variations à une ou plusieurs positions (Primrose et al. 2004). Ce type de primer permet le clonage du gène d'intérêt, grâce à la présence, dans le même mélange, de différentes combinaisons de séquences (« nucléotides dégénérés »). Le design de ce genre de primers se réalise grâce à un alignement multiple de séquences du gène d'intérêt chez des espèces proches.

- Méthode

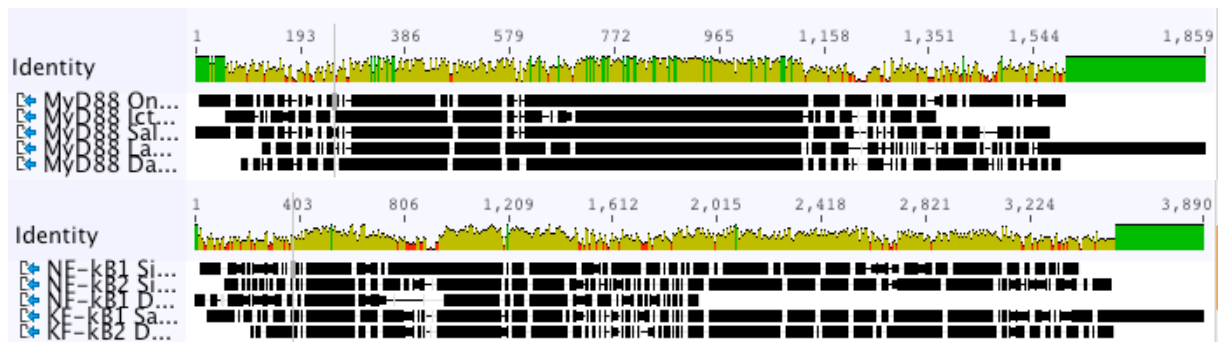
Le design de primers dégénérés commence par la recherche de séquences du gène d'intérêt chez des espèces les plus proches possible de *P. hypophthalmus*, ici, en l'occurrence, des poissons Téléostéens, dans une base de données (DB) (**Tableau 12**). Le choix s'est porté sur la DB « nucléotides » du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, *National Institutes of Health*, USA). L'alignement multiple et le design (**Figure 17**) seront ensuite réalisés grâce au programme « Geneious<sup>®</sup> » (Biomatters Ltd., Nouvelle-Zélande, 2005-2009) et la sélection des primers (selon le facteur de qualité, le niveau de dégénérescence, la taille, ...) (**Tableau 13**) grâce au programme « Fast PCR<sup>®</sup> » (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finlande, 1999-2009).

2°) Extraction d'ARN à partir de tissus frais

- Principe

L'extraction d'ARN à partir de tissus frais est basée sur une technique de centrifugation par séparation de phases. Plusieurs centrifugations sont réalisées, et l'ARN est récupéré successivement dans différentes phases, jusqu'à obtenir de l'ARN plus ou moins pur.





*Figure 18 (suite). Alignement multiple et design de primers dégénérés.*

*Tableau 13. Sélection des primers dégénérés.*

Gènes	Primers	Séquences	Qualité du primer
TLR3	F1	DGTGSTGAARHTKCAGCACA	99
	R1	YAGRATGCTCTCRCASGTGCA	114
	R2	RTCRWABGGRTTVTKVYCCATG	104
	F3	YGAYTGCACSTGYGAGAGCAT	106
	R3	RVGRVAGCARSCKYCKYTCCA	113
TLR9	F1	TTCCAVAACCTGACMARCTT	96
	R1	CCAVASRTCCCAGCCRTAGA	118
	F2	CTSARGCAYCTCTAYGGCTGGGA	132
	R2	CCAGGAYARHACARACTTCCTGCA	126
	R3	AYCTCRTCSARCAGAACCARCAC	127
MyD88	F1	AAAYCCVWSRAACAYKGTGG	95
	R1	TRAGYTCRCTRGYGATGGTC	80
	R2	TRAGYTCRCTRGYGATGGTC	103
TNFα	F2	TGAYNTSGAGRYBGGTCYTGR	N.D.
	F4	CCAGSTGTTTKMHTGGMABTGGA	N.D.
	R4	CDCCTBYRTTMAGCTGRAACAC	N.D.
	R5	CRCCHAGRTADATGGYGTTGT	N.D.

- Méthode

Les tissus sont d'abord homogénéisés dans 600  $\mu$ L de TRIzol. S'ensuit une incubation de 5 minutes à température ambiante ( $T_{amb}$ ), avant l'ajout de 200  $\mu$ L de chloroforme et une seconde incubation de 2-3 minutes ( $T_{amb}$ ). L'homogénat est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 12000 g à 4°C. La phase liquide supérieure (ARN) est récupérée, mélangée à 500  $\mu$ L d'isopropanol et laissée à incuber 10 minutes ( $T_{amb}$ ). Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot (ARN) resuspendu dans 1 mL d'éthanol 75 % froid. Une nouvelle centrifugation pendant 5 minutes à 7500 g à 4°C permet un « lavage » de l'ARN. Le surnageant est une nouvelle fois éliminé et le culot resuspendu dans 30  $\mu$ L d'eau milliQ stérile. Finalement, la solution d'ARN est diluée au centième dans de l'eau milliQ stérile avant la lecture de la DO pour permettre la quantification de l'ARN ainsi isolé.

- Calcul

La DO est mesurée au spectrophotomètre. Celui-ci renseigne les informations suivantes (entre parenthèses, les valeurs optimales) : concentration d'ARN ( $[ARN] > 150 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), les DO à 230, 260 et 280 nm ( $0,5 < DO(260) < 1$ ) et les rapports de DO 260/280 et 260/230 ( $DO(260/280) > 1,6$  et  $DO(260/230) > 1$ ).

### 3°) Reverse Transcription (RT)

- Principe

La reverse transcription est basée sur le principe de rétrotranscription : une reverse transcriptase (ADN polymérase ARN-dépendante) va rétrotranscrire l'ARN en ADNc (ADN complémentaire : ADN ne comportant que des exons).

- Méthode

4  $\mu$ g d'ARN sont utilisés. On commence par l'ajout d'eau DEPC (de manière à obtenir un volume ARN+eau de 11  $\mu$ L) et 1  $\mu$ L de primer oligo (dt)18. Le mix est mis à incuber pendant 5 minutes à 70°C. Ensuite, sont ajoutés au mix 4  $\mu$ L de *Reaction buffer* 5x, 1  $\mu$ L de *Riboblock Ribonuclease Inhibitor* et 2  $\mu$ L de dNTP mix. Le mix est de nouveau mis à incuber pendant 5 minutes à 37°C.

Enfin, 1  $\mu\text{L}$  de *RevertAid<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* est ajouté au mix. Celui-ci est mis à incuber pendant 1 heure à 42°C, puis pendant 10 minutes à 70°C.

4°) *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

- Principe

La PCR est basée sur la succession de réactions de réplication d'une matrice ADN double brin, grâce à des primers spécifiques (forward et reverse) et une ADN polymérase ADN-dépendante (Taq polymérase par exemple). Cette succession de réplifications se réalise via la répétition de cycles de transition de température (dénaturation de la matrice, hybridation avec les primers, élongation des brins néoformés), permettant une amplification de l'ordre du million d'une séquence spécifique d'ADN.

- Méthode

5  $\mu\text{L}$  d'ADNc sont utilisés. Il faut y ajouter 30,75  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ stérile, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix, 10  $\mu\text{L}$  de PCR Reaction buffer, 1,5  $\mu\text{L}$  de primer forward, 1,5  $\mu\text{L}$  de primer reverse et 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq polymérase. Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur, qui prend en charge la succession des cycles PCR : 10 minutes à 95°C (dénaturation initiale), 1 minute à 95°C (dénaturation), 1 minute à la température spécifique des primers (hybridation), 1 minute à 72°C (élongation), 10 minutes à 72°C (élongation finale). Les 3 étapes d'1 minute sont répétées 40 fois.

5°) *Electrophorèse sur gel d'agarose*

- Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques sous l'effet d'un champ électrique (l'ADN et l'ARN, chargés négativement, migrent vers l'anode, l'électrode positive). Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petite taille se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de taille supérieure (un étalon permet d'évaluer les tailles). Cette technique permet de vérifier si la PCR a bien amplifié la séquence cible.

- Méthode

L'électrophorèse commence d'abord par la préparation du gel d'agarose : 500 mg d'agarose et 50 mL de tampon TAE 1x sont portés à ébullition, avant l'ajout de 5 µL de SYBR Safe. Le gel est coulé dans un support muni de peignes (puits) et laissé à refroidir. Une fois polymérisé, il sera placé dans une cuve et immergé avec du tampon TAE 1x. Il faut ensuite placer 5 µL de ladder (étalon permettant d'évaluer les tailles) dans le premier puits, et les mix échantillons (5 µL de produit PCR, 3 µL de loading dye 6x, 10 µL d'eau milliQ stérile) dans les autres puits. Le ladder (une échelle de 1 kb avec une marque tous les 100 bp) et les mix vont migrer à travers le gel pendant 30 minutes, sous une différence de potentiel de 80 V et une intensité du courant électrique de 60-70 mA. Le résultat de la migration sera visualisé sous UV.

c. Production des amorces des gènes d'intérêt

1°) Purification de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose

- Principe

La purification de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose consiste à récupérer des séquences cibles précédemment amplifiées par PCR.

- Méthode

La première étape consiste à réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose, en modifiant les proportions du mix échantillons (10 µL de produit PCR, 3 µL de loading dye 6x, 5 µL d'eau milliQ stérile) et en préparant des puits doubles. La bande d'ADN cible est ensuite découpée à l'aide d'un scalpel stérile et pesée. Le gel est ensuite dissout par l'ajout de 300 µL de QX1 pour 100 milligrammes de gel (resuspension au vortex) puis de 30 µL QIAEX/100 mg gel. Le mélange est ensuite incubé pendant 10 minutes à 50°C au bain-marie (vortexer toutes les 2 minutes). Puis, il est centrifugé pendant 30 secondes à 13200 g. Le surnageant est éliminé et le culot rincé une fois avec 500 µL de QX1 et deux fois avec 500 µL de PE. Le culot est mis à sécher pendant 15 minutes à température ambiante. Il est ensuite resuspendu dans 20 µL d'eau milliQ stérile et laissé à incuber pendant 5 minutes à température ambiante.

Finalement, la resuspension est centrifugée pendant 30 secondes à 13200 g et le surnageant récupéré (ADN purifié).

## 2°) Clonage en bactéries

- Principe

Les bactéries sont utilisées dans le clonage de gènes pour deux raisons : leur vitesse de multiplication (toutes les 20 minutes à 37°C chez *Escherichia coli*) et la sélection aisée de bactéries recombinantes. Le clonage est basé sur le principe de la transformation bactérienne. La séquence d'ADN cible est insérée dans le plasmide pUC19 (ADN circulaire non chromosomique) suite à un choc thermique. Les bactéries possédant le plasmide pUC19 sont sélectionnées grâce à la présence d'un gène de résistance à l'ampicilline sur ce plasmide. Le point d'insertion se localise au milieu du gène de la  $\beta$ -galactosidase (opéron *lacZ*), qui est de ce fait silencé chez les bactéries transformées. Celles-ci sont donc incapables de métaboliser le X-Gal (analogue du lactose) et apparaissent donc blanches. Les autres sont bleues. Ce test est plus communément appelé « test bleu/blanc » ou  $\alpha$ -complémentation.

- Méthode

Le clonage en bactéries commence par la préparation des milieux de culture stériles (25 mL de milieu LB, 375 mg d'agar, 25  $\mu$ L d'ampicilline et 25  $\mu$ L de X-Gal) en boîtes de Pétri et du mélange réactionnel (4  $\mu$ L d'ADN purifié, 1  $\mu$ L de Salt Solution et 1  $\mu$ L de TOPO Vector). Ensuite, 2  $\mu$ L de mélange réactionnel sont ajoutés aux bactéries décongelées sur glace (travailler en conditions stériles). Après une incubation de 30 minutes sur glace, le choc thermique est provoqué : 30 secondes à 42°C au bain-marie. Les bactéries sont replacées sur glace pendant 2 minutes avant l'ajout de 250  $\mu$ L de milieu SOC. Le mélange est agité horizontalement pendant 1 heure à 225 rpm à 37°C. Les bactéries ainsi transformées sont mises à incuber toute la nuit à 37°C en boîtes de Pétri (50-100  $\mu$ L bactéries/boîte). Enfin, le test bleu/blanc est réalisé visuellement, et les bactéries blanches sélectionnées en vue de la

suite de l'expérience. Elles seront repiquées dans un but de sélection exclusive des colonies blanches.

3°) PCR à partir d'un clonage en bactéries

- Principe

Le principe de la PCR a été présenté au point **5. b. 4°)** « *Polymerase Chain Reaction (PCR)* ».

- Méthode

On commence par préparer le mix PCR : 40,75 µL d'eau milliQ stérile, 1µL de dNTP mix, 5 µL de PCR Reaction buffer, 1 µL de primer forward M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), 1 µL de primer reverse M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') et 0,25 µL de Taq polymérase. Les bactéries sont ensuite ajoutées à l'aide d'un tips. Le mélange est placé dans un thermocycleur, qui prend en charge la succession des cycles PCR : 10 minutes à 95°C (dénaturation initiale), 1 minute à 95°C (dénaturation), 1 minute à 55°C (hybridation), 1 minute à 72°C (élongation), 10 minutes à 72°C (élongation finale). Les 3 étapes d'1 minute sont répétées 30 fois. La PCR sera ensuite vérifiée grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose.

4°) Séquençage des gènes d'intérêt

Le séquençage des gènes a été confié à la firme Macrogen Inc. (USA). La séquence trouvée a ensuite été blastée dans la base de données NCBI pour confirmer le séquençage. L'alignement de tous les résultats du séquençage a ensuite généré une séquence consensus, à partir de laquelle sera réalisée la mesure de l'expression des TLR.

d. Quantification de l'expression des gènes d'intérêts

1°) Extraction d'ARN à partir de tissus frais

Le principe, la méthode et le calcul sont les mêmes que pour le point **5. b. 2°)** « Extraction d'ARN à partir de tissus frais ».

2°) Reverse Transcription (RT)

Le principe et la méthode sont les mêmes que pour le point **5. b. 3°)** « *Reverse Transcription (RT)* ».

**Tableau 14. Primers du gène ménage et de MyD88 (Q-PCR).**

Gène	N.A.	Séquence (5' → 3')	T.A. (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
12S rRNA	AY458881	F: CCTAGCCTATGTGTACGC	183	59,2
		R: CGAGGCTTATGTTTGCCG		60,0
16S rRNA	FJ432682	F: TATCTTCGGTTGGGGCG	223	60,0
		R: CCTGATCCAACATCGAGG		60,0
β-actin	EU527191	F: TGTATCGCCTCTGGTCGT	176	59,8
		R: AAGCTGTAGCCTCTCTCG		59,9
MyD88	Designer	F: ACACCTGAACAGGAAGCTCCT	234	49,2
		R: TCGCCGAGAAAATGGAGTTCACC		51,9

*Note: N.A. : numéro d'accèsion (il se réfère à la séquence enregistrée dans la base de donnée), T.A. : taille de l'amplicon, T<sub>m</sub> : température de fusion.*

3°) Real Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)

- Principe

La méthode de mesure de l'expression d'un gène consiste en une *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR quantitative ou Q-PCR). Le principe général de la Q-PCR est basé sur la détection et la quantification de la fluorescence (soit d'un agent intercalant se liant à l'ADN, soit d'une sonde), dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (Poitras and Houde 2002).

- Méthode

L'ADNc utilisé pour la Q-PCR doit au préalable être dilué 50 fois (d'abord une dilution 10, puis une dilution 5). Il faut aussi prévoir une courbe standard. Celle-ci se base sur un mix de 20 échantillons différents (2 µL/échantillon), auquel sera ajoutée de l'eau milliQ stérile pour obtenir les dilutions suivantes : 25, 50, 100, 200 et 400. On prépare ensuite le mix Q-PCR (10 µL de SYBR Green Master mix, 2,5 µL de primer forward et 2,5 µL de primer reverse) (**Tableau 14**), que l'on ajoutera aux 5µL d'ADNc dilué 50 fois déjà présents dans les puits.

- Calcul

Le niveau d'expression d'ARN est déduit par rapport aux concentrations de la courbe standard des valeurs de C.T. (*Cycle Threshold*) et comparé au niveau d'expression du gène ménage (mesure relative).

**6. Traitement statistique des données**

Les données brutes ont été encodées dans *Microsoft Office Excel:Mac*® 2004. Les tableaux générés ont servi de base à l'analyse statistique par le programme *Statistica 5.5*® 1984-2004 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Cette analyse correspond à une ANOVA III croisée fixe dont les facteurs sont : période de repos (absence ou présence), échantillonnage (avant le challenge (T0) ; premier prélèvement après le début du challenge (T1), avec et sans bactéries ; deuxième prélèvement après le début du challenge (T2), avec et sans bactéries, et concentration en LPS (0, 0,5 et 5 mg/kg masse corporelle). L'équation de base du modèle est la suivante :



$$x_{(ijk)l} = \mu + r_i + t_j + l_k + rt_{ij} + rl_{ik} + tl_{jk} + rtl_{ijk} + E_{(ijk)l}$$

avec  $x_{(ijk)l}$  = observation ;  $\mu$  = paramètre (moyenne) ;  $r_i$ ,  $t_j$ ,  $l_k$  = facteurs (respectivement période de repos, échantillonnage, concentration en LPS) ;  $rt_{ij}$ ,  $rl_{ik}$ ,  $tl_{jk}$ ,  $rtl_{ijk}$  = interaction entre les 3 facteurs ;  $E_{(ijk)l}$  = variabilité résiduelle. Le calcul de l'ANOVA proprement dit est précédé de la vérification de l'homoscédasticité via les tests de Hartley et de Levene. En cas d'homogénéité des variances, l'ANOVA est réalisée. Les résultats significatifs, hautement significatifs et très hautement significatifs sont définis avec une erreur  $\alpha$  respectivement égale à 0,05, 0,01 et 0,001. Ils seront confrontés entre eux via les tests *post-hoc* t-multiple protégé LSD (*Least Significant Difference*) et Newman-Keuls. Les graphiques présentés dans cette section ont été réalisés avec *Microsoft Office Excel:Mac*® 2004 à partir des résultats significatifs de l'analyse statistique.

## IV. RESULTATS

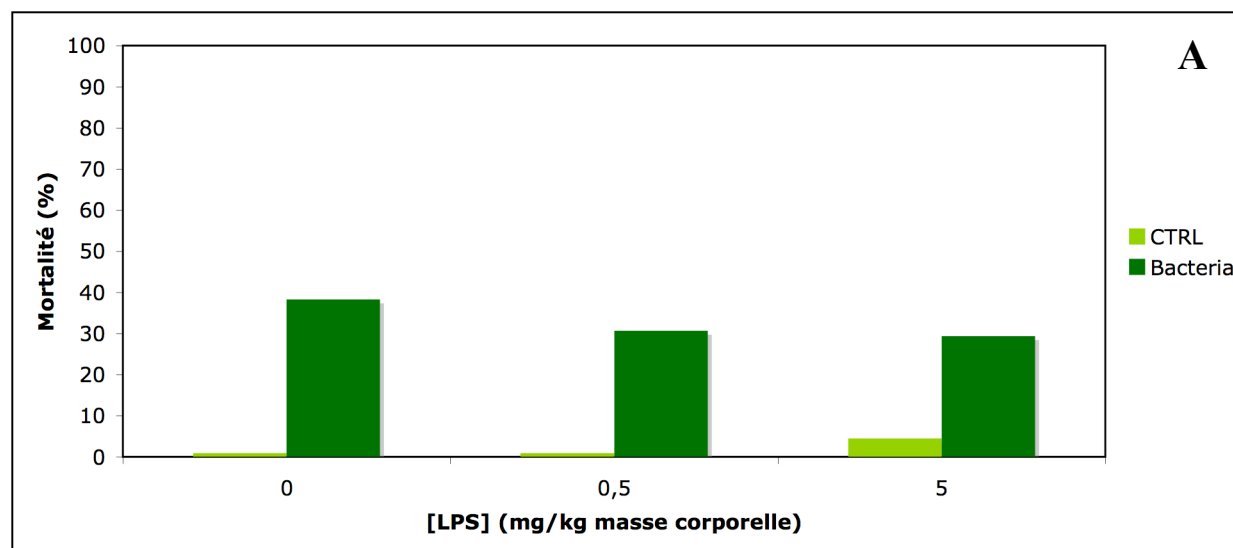
Cette section passe en revue l'ensemble des résultats significatifs obtenus à la fin de l'expérience. Les valeurs utilisées pour l'analyse statistique sont reprises dans la partie « annexes ».

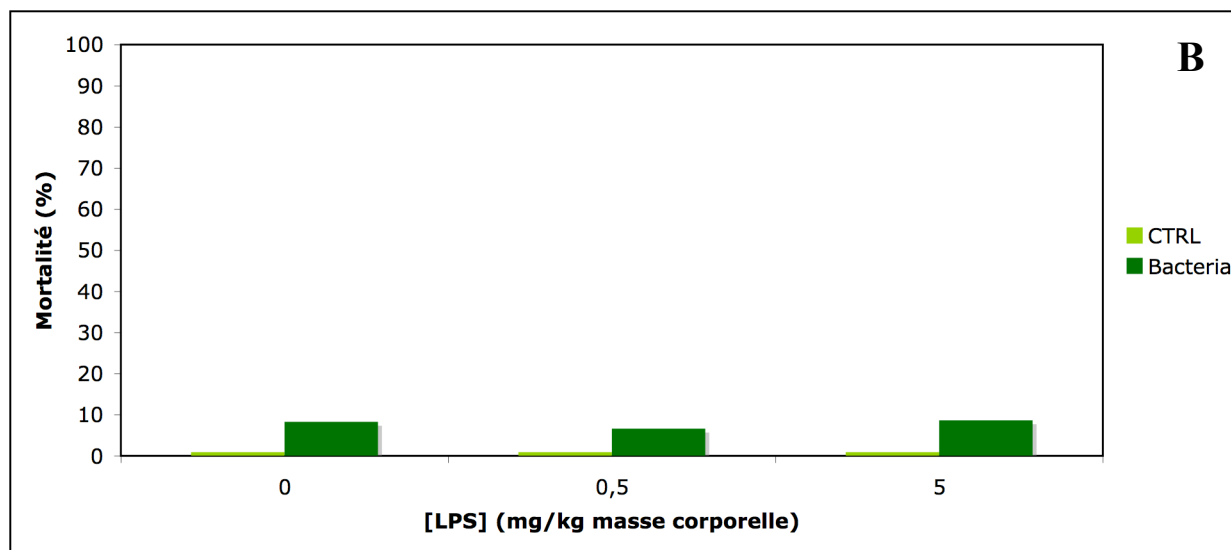
### 1. Introduction

La présente expérience a été réalisée du 15 juin au 15 septembre 2009 pour les parties « élevage et échantillonnage » et du 1<sup>er</sup> août au 15 décembre 2009 pour les différentes parties « mesures ». Les poissons ont été nourris 3 fois par jour et les bassins ont été siphonnés au début de chaque jour (système en circuit fermé avec eau stagnante). Dans l'ensemble, les poissons avaient un comportement très grégaire et se rassemblaient préférentiellement sur le fond. Etant donné que les bassins devaient être siphonnés tous les jours pour évacuer les résidus de nourriture et les déchets excrétés par les poissons, ceux-ci étaient relativement stressés et semblaient manger peu.

### 2. Suivi de la mortalité

La mortalité des poissons-contrôles est inférieure à 5 %. La mortalité des poissons-tests varie en fonction de la présence d'une période de repos : 32,8 % sans repos contre 7,9 % avec repos (*Figure 18*).



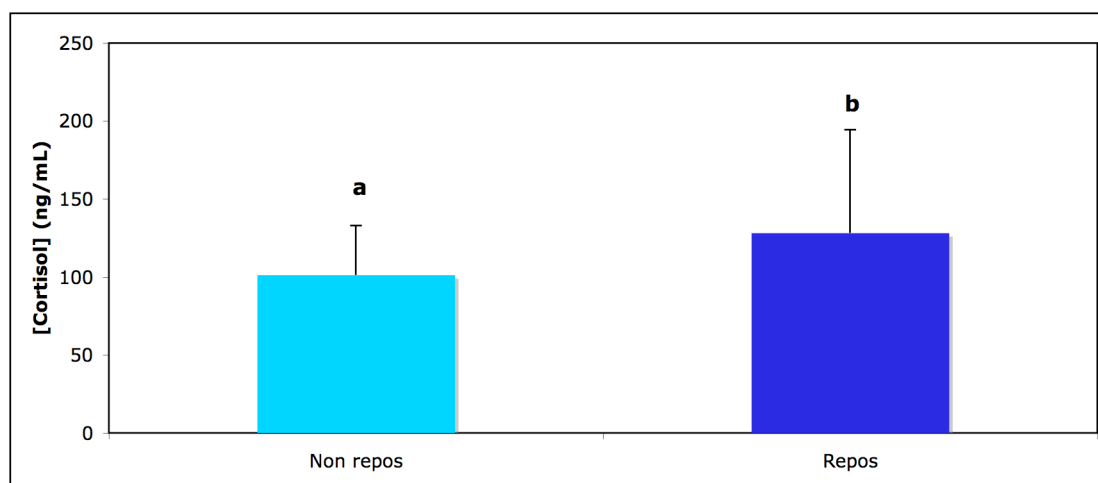


*Figure 18. Influence de la période de repos et de la présence de bactéries sur la mortalité (%) en fonction de la concentration en LPS (mg de LPS/kg de masse corporelle). A : absence d'une période de repos. B : présence d'une période de repos. CTRL : poissons-contrôles, Bacteria : poissons-tests.*

### 3. Mesure de la réponse au stress

#### a. Cortisol

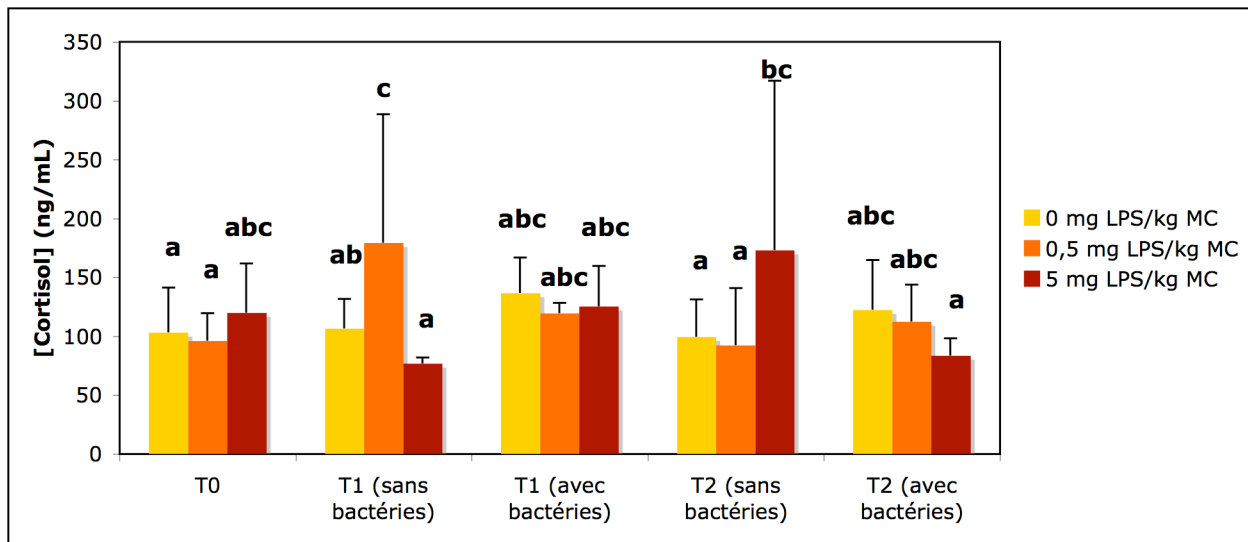
Les concentrations en cortisol plasmatique sont significativement plus élevées en présence d'une période de repos ( $p=0,049$ ) : 128 ng/mL pour les poissons avec période de repos contre 101 ng/mL sans période de repos ( $p=0,049$ ) (**Figure 19**).



**Figure 19. Influence de la période de repos sur les concentrations de cortisol plasmatique (ng de cortisol/mL de plasma).**

La période d'échantillonnage et la concentration en LPS n'influencent les concentrations en cortisol plasmatique qu'au sein des poissons-contrôles ( $p=0,043$ ) (**Figure 20**). On remarque en effet que les poissons T1 nourris avec 0,5 mg LPS/kg ont des concentrations plus élevées que les poissons T0 et T2 : 179 ng/mL contre 96 et 92 ng/mL respectivement ( $p=0,009$  et  $p=0,017$ ). Le même constat peut être fait pour les poissons T2 nourris avec 5 mg LPS/kg par rapport aux poissons T0 et T1 : 173 ng/mL contre 120 et 77 ng/mL ( $p=0,009$ ). Il y a donc un effet temps, avec un pic de concentration 7 jours après le début du challenge pour 0,5 mg LPS/kg et 14 jours après le début du challenge pour 5 mg LPS/kg.

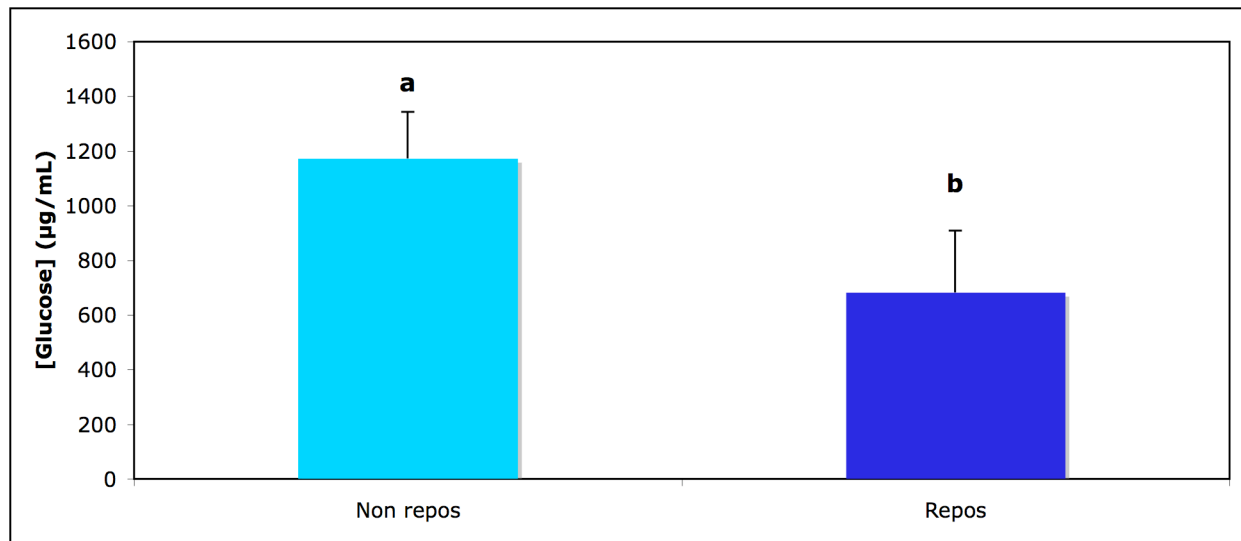
La concentration en LPS pour une même période d'échantillonnage (T1 et T2) influence les concentrations en cortisol plasmatique : à T1, les concentrations en cortisol sont plus élevées pour 0,5 mg LPS/kg ( $p=0,044$  et  $p=0,006$ ) que pour 0 et 5 mg LPS/kg (107 et 77 ng/mL) ; à T2, la même observation peut être faite pour 5 mg LPS/kg ( $p=0,015$ ) contre 0 et 0,5 mg LPS/kg (100 et 92 ng/mL). Il y a donc un effet dose avec un pic de concentration pour 0,5 mg LPS/kg 7 jours après le début du challenge et pour 5 mg LPS/kg 14 jours après le début du challenge.



**Figure 20. Influence de la période d'échantillonnage, de la présence de bactéries et de la concentration en LPS (mg de LPS/kg de masse corporelle – MC). T0 : échantillonnage avant l'injection bactérienne, T1 et T2 : échantillonnage 7 et 14 jours après injection.**

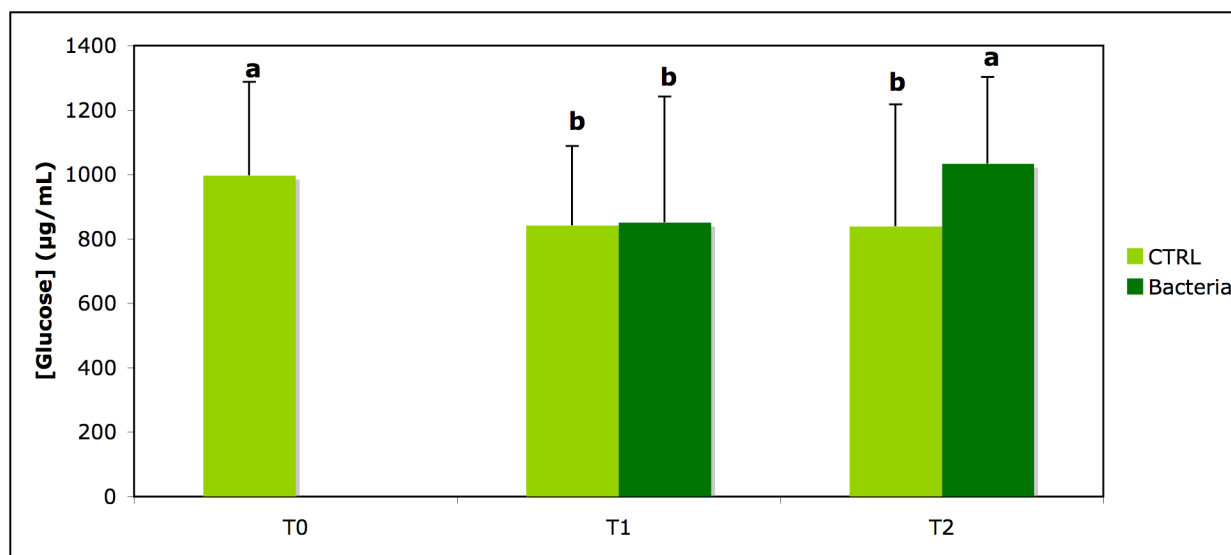
b. Glucose

Les concentrations en glucose plasmatique diminuent de manière très hautement significative ( $p < 0,001$ ) avec le temps, indépendamment de la dose de LPS testée : on passe de 1171  $\mu\text{g/mL}$  à 681  $\mu\text{g/mL}$ , soit une diminution de moitié (**Figure 21**).



**Figure 21. Influence de la période de repos sur la concentration de glucose plasmatique ( $\mu\text{g}$  de glucose/mL de plasma).**

Les concentrations en glucose plasmatique varient aussi de manière hautement significative ( $p = 0,004$ ) en fonction de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries (**Figure 22**). Les poissons-contrôles de l'échantillonnage T0 ont une concentration plus élevée, 996,66  $\mu\text{g/mL}$ , que ceux des échantillonnages T1 et T2, respectivement 843 et 839  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,011$  et  $p = 0,017$ ). Au sein des poissons-test, c'est l'échantillonnage T2 qui présente la valeur la plus élevée : 1034  $\mu\text{g/mL}$  pour 852  $\mu\text{g/mL}$  chez les poissons T1 ( $p = 0,009$ ). La même observation peut être faite au sein des poissons T2 : 1034  $\mu\text{g/mL}$  pour les tests et 839 pour les contrôles ( $p = 0,006$ ).



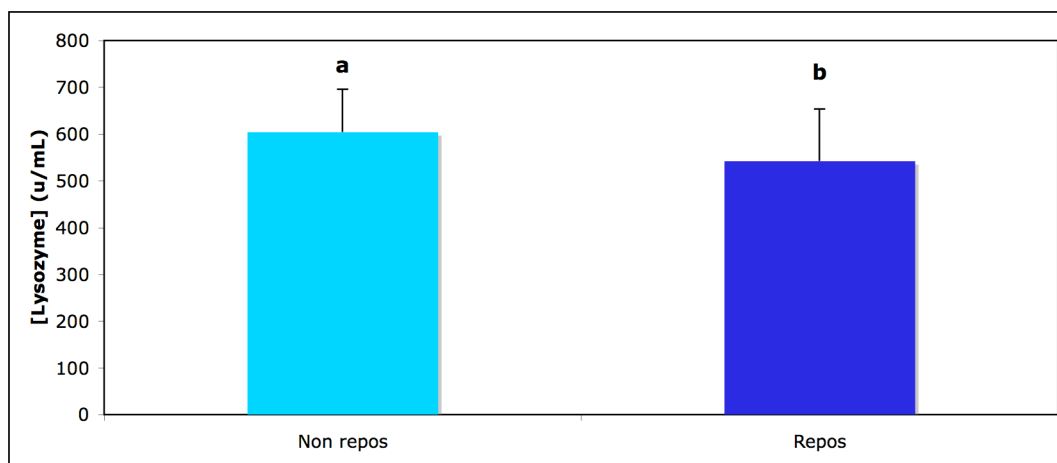
**Figure 22.** Influence de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries sur les concentrations de glucose plasmatique (µg de glucose/mL de plasma). T0 : échantillonnage avant l'injection bactérienne, T1 et T2 : échantillonnage 7 et 14 jours après injection. CTRL : poissons-contrôles, Bacteria : poissons-test.

#### 4. Mesure de la réponse immunitaire

##### a. Lysozyme

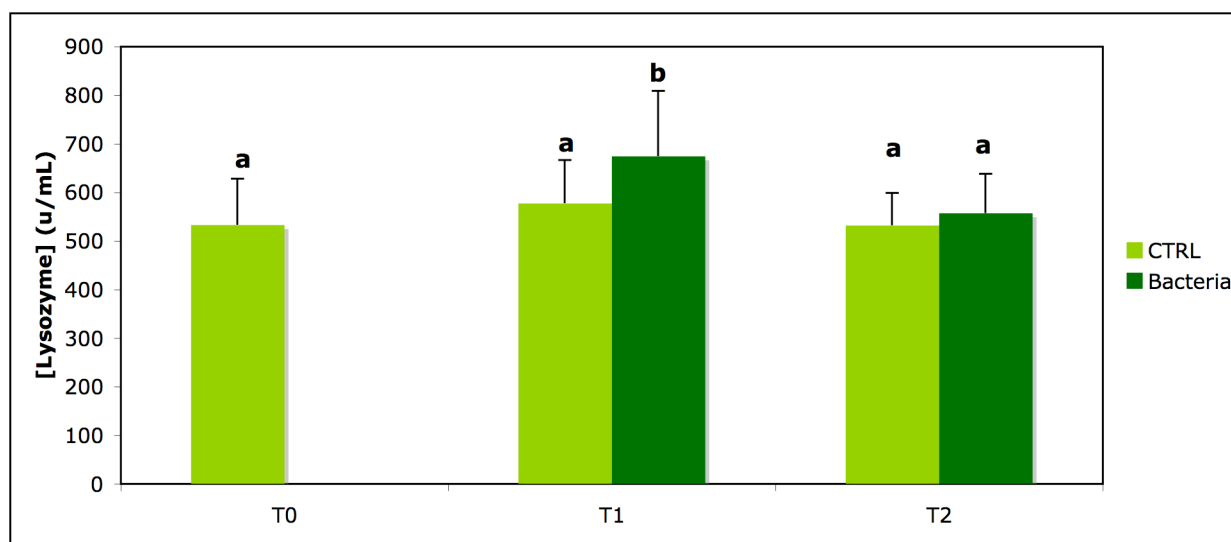
##### 1°) Lysozyme plasmatique

Les concentrations en lysozyme plasmatique diminuent de manière significative ( $p=0,016$ ) avec le temps, indépendamment de la dose de LPS testée : on passe de 604 u/mL pour les poissons sans période de repos à 542 u/mL (**Figure 23**).



**Figure 23. Influence de la période de repos sur les concentrations en lysozyme plasmatique (unités de lysozyme/mL de plasma).**

Les concentrations en lysozyme plasmatique varient aussi de manière hautement significative ( $p=0,004$ ) en fonction de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries (**Figure 24**). Les poissons-tests de l'échantillonnage T1 ont une concentration plus élevée que ceux de l'échantillonnage T2 : 675 u/mL contre 557 u/mL ( $p=0,004$ ). De plus, ils ont des valeurs de lysozyme plus élevées que les poissons-contrôles T0 et T1 ( $p=0,016$ ) : 675 u/mL contre 578 u/mL et 534 u/mL.

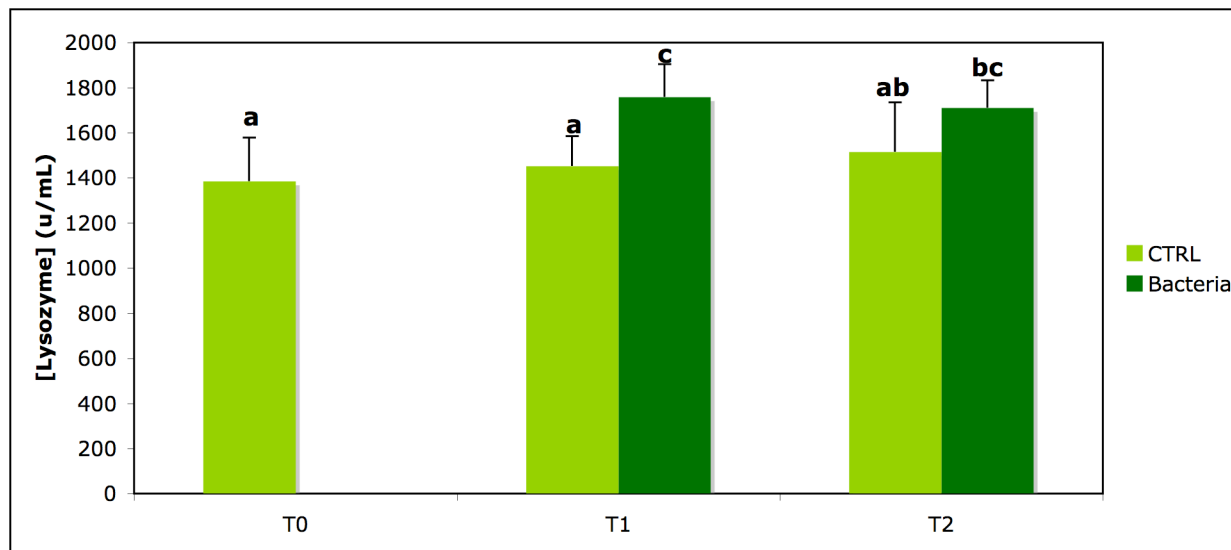


**Figure 24. Influence de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries sur les concentrations en lysozyme plasmatique (unités de lysozyme/mL de plasma). T0 : échantillonnage avant l'injection bactérienne, T1 et T2 : échantillonnage 7 et 14 jours après injection. CTRL : poissons-contrôles, Bacteria : poissons-test.**

## 2°) Lysozyme dans la rate

Les concentrations en lysozyme dans la rate varient aussi de manière très hautement significative ( $p<0,001$ ) en fonction de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries (**Figure 25**). Les poissons-tests T1 ont une

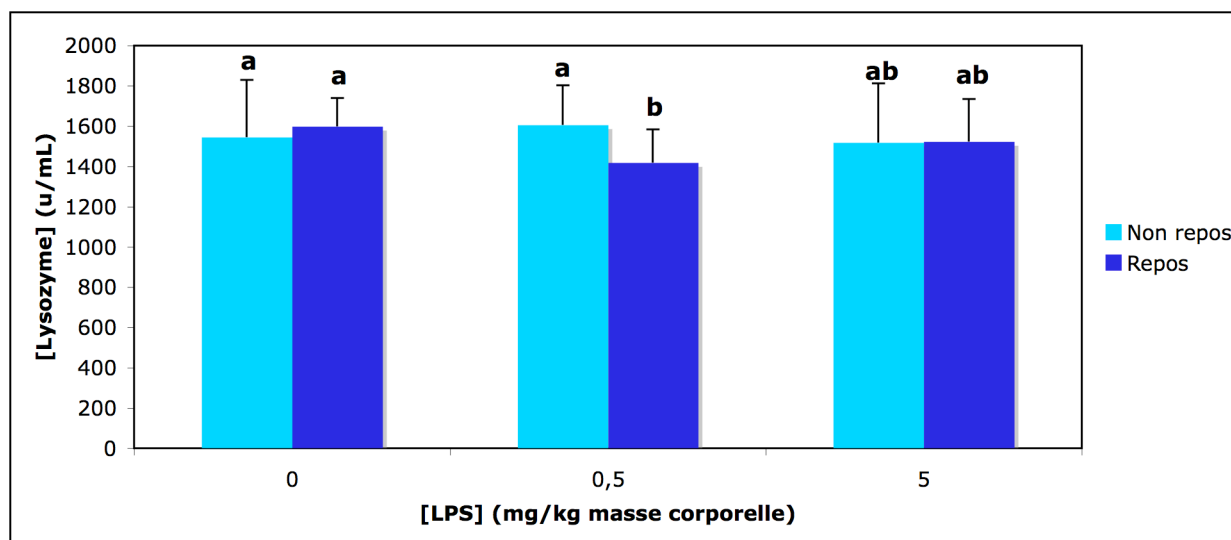
concentration plus élevée les poissons-contrôles T0 et T1 : 1758 u/mL contre, respectivement, 1385 u/mL et 1454 u/mL ( $p=0,002$ ).



**Figure 25.** Influence de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries sur les concentrations de lysozyme dans la rate (unités de lysozyme/mL d'homogénat de rate). T0 : échantillonnage avant l'injection bactérienne, T1 et T2 : échantillonnage 7 et 14 jours après injection. CTRL : poissons-contrôles, Bacteria : poissons-test.

La période de repos d'une part et la dose de LPS d'autre part influencent de manière significative ( $p=0,046$ ) les concentrations en lysozyme dans la rate (**Figure 26**). A une dose de 0,5 mg LPS/kg, celles-ci sont plus élevées pour des poissons sans période de repos qu'avec période de repos : 1605 contre 1419 u/mL ( $p=0,022$ ). La même dose, avec une période de repos, fait diminuer l'activité du lysozyme par rapport aux poissons-contrôles, mais pas par rapport aux poissons-tests nourris avec 5 mg LPS/kg : 1419 u/mL contre 1598 et 1523 u/mL ( $p=0,002$ ).

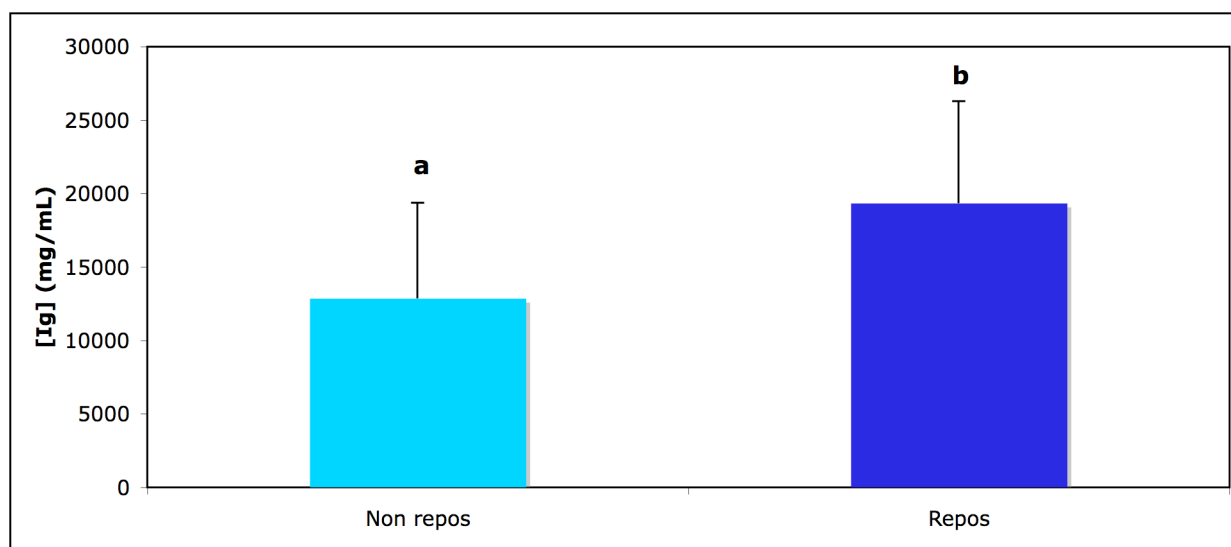




**Figure 26.** Influence de la période de repos et de la concentration en LPS (mg de LPS/kg de masse corporelle) sur les concentrations en lysozyme de la rate (u/mL d'homogénat de rate).

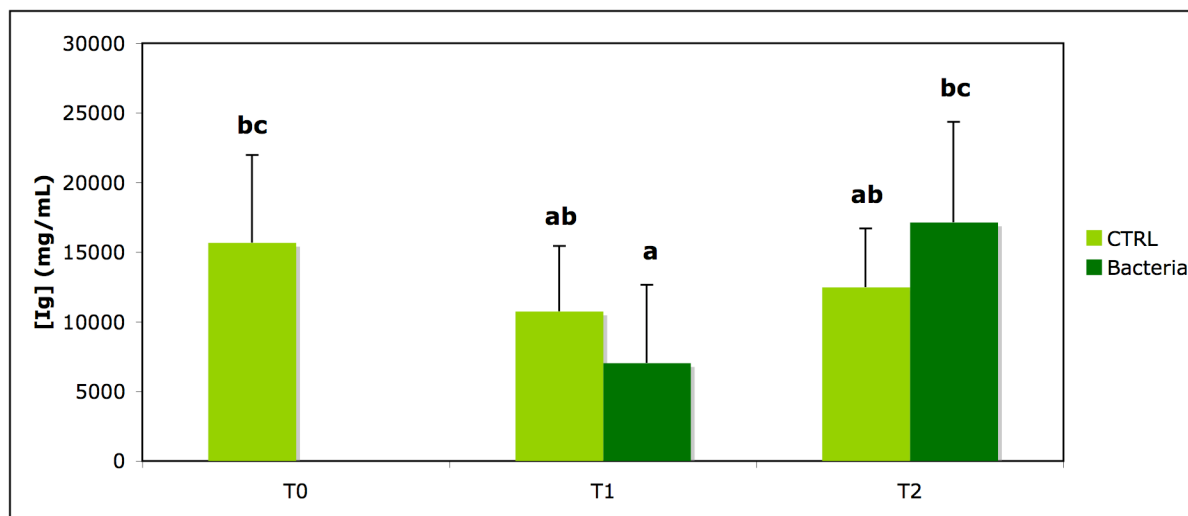
b. Immunoglobulines

Les concentrations en Ig plasmatiques augmentent de manière très hautement significative ( $p=0,016$ ) avec le temps, indépendamment de la dose de LPS testée : on passe de 12870 mg/mL pour les poissons sans période de repos à 19347 mg/mL pour les poissons avec période de repos (**Figure 27**).



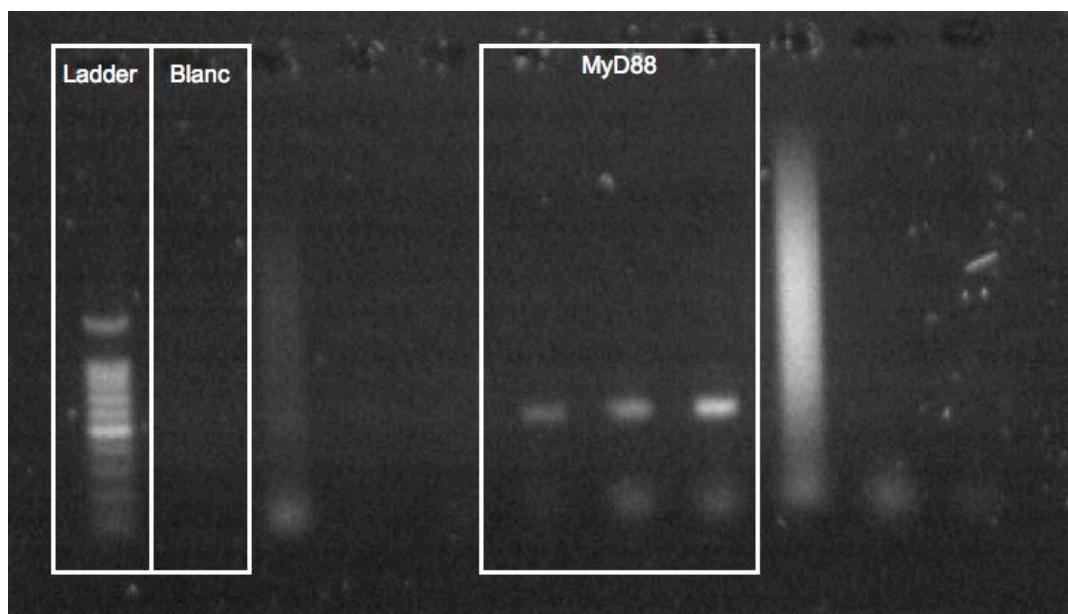
**Figure 27.** Influence de la période de repos sur les concentrations d'Ig plasmatiques (mg d'Ig/mL de plasma).

La période d'échantillonnage influence la concentration en Ig plasmatiques de manière significative ( $p=0,014$ ) pour les poissons-tests lors de l'absence d'une période de repos (**Figure 28**). En effet, les poissons de T1 ont des concentrations en Ig plus faibles que ceux de T2 : 7024 mg/mL contre 17128 mg/mL ( $p=0,008$ ).

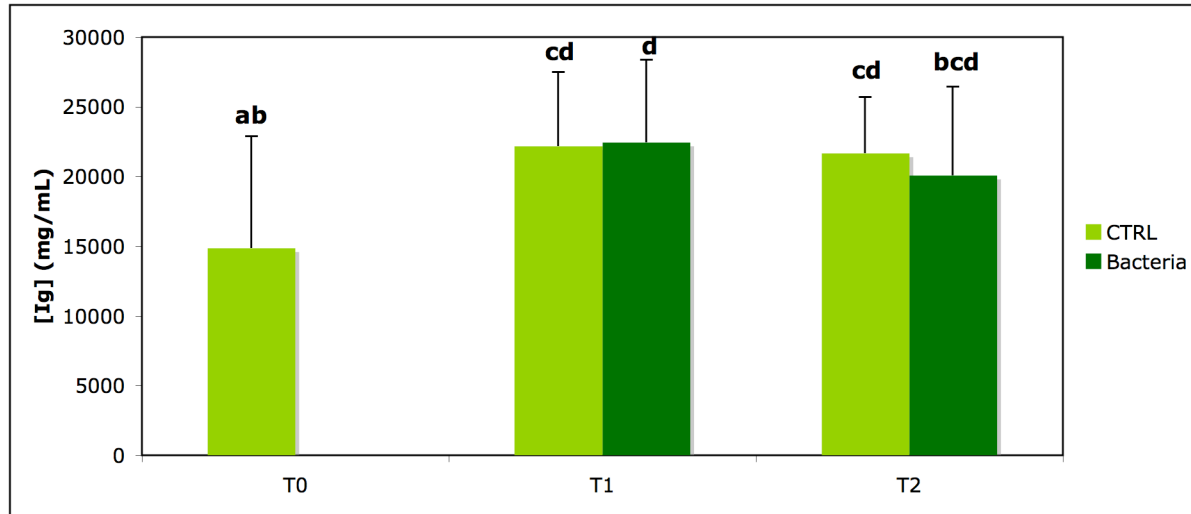


**Figure 28.** Influence de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries sur les concentrations d'Ig plasmatiques (mg d'Ig/mL de plasma) en absence d'une période de repos.

La période d'échantillonnage influence la concentration en Ig plasmatiques de manière significative ( $p=0,014$ ) pour les poissons-contrôles lors de la présence d'une période de repos (**Figure 29**). En effet, les poissons de T0 ont des concentrations en Ig plus faibles que ceux de T1 et T2 : 14862 mg/mL contre 22172 et 21680 mg/mL ( $p=0,025$  et  $p=0,036$ ).



*Figure 30. Gel d'électrophorèse du gène MyD88 en vue de la sélection de primers.*



**Figure 29.** Influence de la période d'échantillonnage et de la présence de bactéries sur les concentrations d'Ig plasmatiques (mg d'Ig/mL de plasma) en présence d'une période de repos.

## 5. Mesure de la régulation de l'expression des TLR et des molécules auxiliaires

### a. Sélection des gènes d'intérêts

Les gènes étudiés ont été sélectionnés sur base de leur implication dans la reconnaissance du pathogène (TLR, MyD88 et NF- $\kappa$ B) et dans la lutte contre celui-ci (TNF $\alpha$ ).

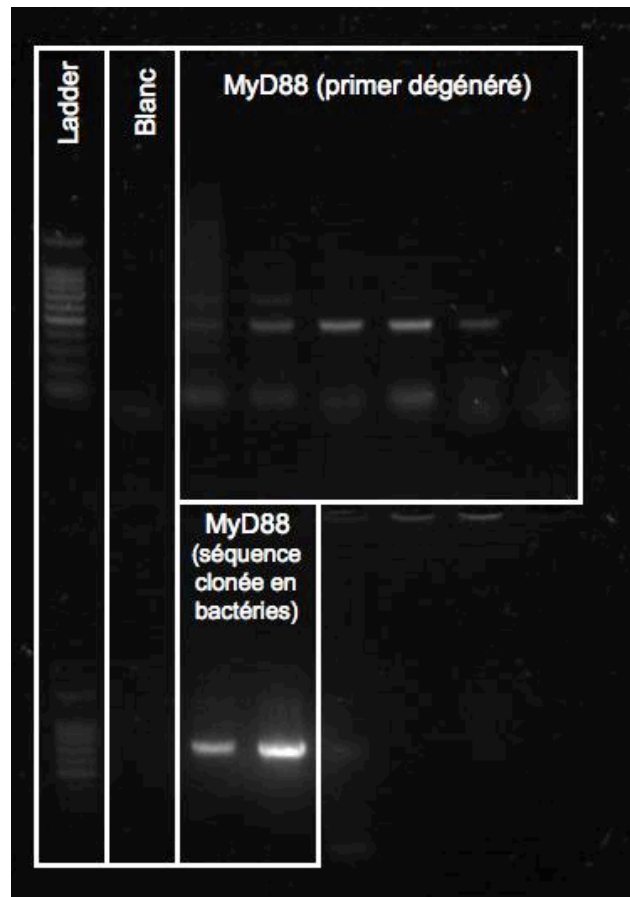
### b. Obtention des primers des gènes d'intérêts

#### 1°) Design de primers dégénérés

Contrairement à nos attentes, il n'a pas été possible de designer les primers des TLR2 et 5 ni de NF- $\kappa$ B. La séquence des primers des TLR3 et 9, de MyD88 et du TNF $\alpha$  sont repris dans le **Tableau 13**.

#### 2°) Extraction d'ARN, RT, PCR et gel d'électrophorèse

Ces différentes étapes de la manipulation préliminaire ont conduit à l'identification du primer dégénéré grâce auquel la séquence du gène d'intérêt pourra être clonée. Nous n'avons obtenu d'amplification que pour le gène de MyD88 (**Figure 30**). Ce manque d'amplification pour les TLR3 et 9 sera discuté plus loin.



*Figure 31. Gel d'électrophorèse du gène MyD88 en vue du séquençage du gène.*

*Tableau 15. Séquence consensus du gène de MyD88.*

```

5'- NGNNNNTTCCGGCAGAGTCACGGTCACACACACAGCTTCAGGTTGTAGTCGGT
CTGCTCCAGCTGTCTGATCATCTCATGGACAAACTGGAAGTCGCTCTGGCAGTAG
CAAATGAATGCGTCGAACATCTCCGGCATGTGACCGTCATTTACGGTGATGCCTC
GATCCTGGTGCCTGCTGTCCACCTCGGGCACCTGAACAGGAAGCTCCTTTTGCCT
CTCTAGATACTCCCTGCAGTCGTCATCTATAAGCGGGCGCAGGTCTGAGATGATG
TCCTTCCTCTCCGCCTGCTCCAGGAAGGACAGCAGCTTCGCCACCGTGGCCCCGG
CGCGGGTCTGCCAGTCCTCCAGCAGCTTCTGGGTGGGATTCTCTCGCTTCTCGTAG
TTTTTAATCTCCAGGTAGGTGAACTCCATTTTCTCGGCGATTTTCAGTCCAGTCTGC
TGCCACAATGTTCCACGGATTTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTAC
TAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG
TCACCTAAATAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGTTBTTTTCCTGAGGGACCCYT
CAATTTBTTATHATTTKAACCCAAAHCCGGGGCGVCCCCCHGGCSGGAVGHTHTAA
AGGGKACAGHTTGCGGTGCACTAADGAGTCGTAGATCTAACTCACAGTGGCTGC
GTTTGCAAAAGAGWGGAACGCTTTCRGTCTRGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA
TTAATGAATCGGCCAACGCTGCGGGGAGAGSCGGTTTGCGTATTGRGCGCTCTTC
CGCTTCYTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCAGCGKATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACNGTTATCCACAGAATCAGGGATACGCAGGAA
AGACATGKKAKCAAAGCCAGCATAGYCAGRMCGTAAATGCNGTGCT-3'

```

c. Production des amorces des gènes d'intérêt

1°) Purification de fragments d'ADN, clonage en bactéries, PCR en bactéries et gel d'électrophorèse

Ces différentes étapes de la manipulation préliminaire ont conduit au clonage du gène d'intérêt, à partir duquel la séquence sera déduite.

La **Figure 31** présente le gel d'électrophorèse pour les primers dégénérés et le gène cloné en bactéries.

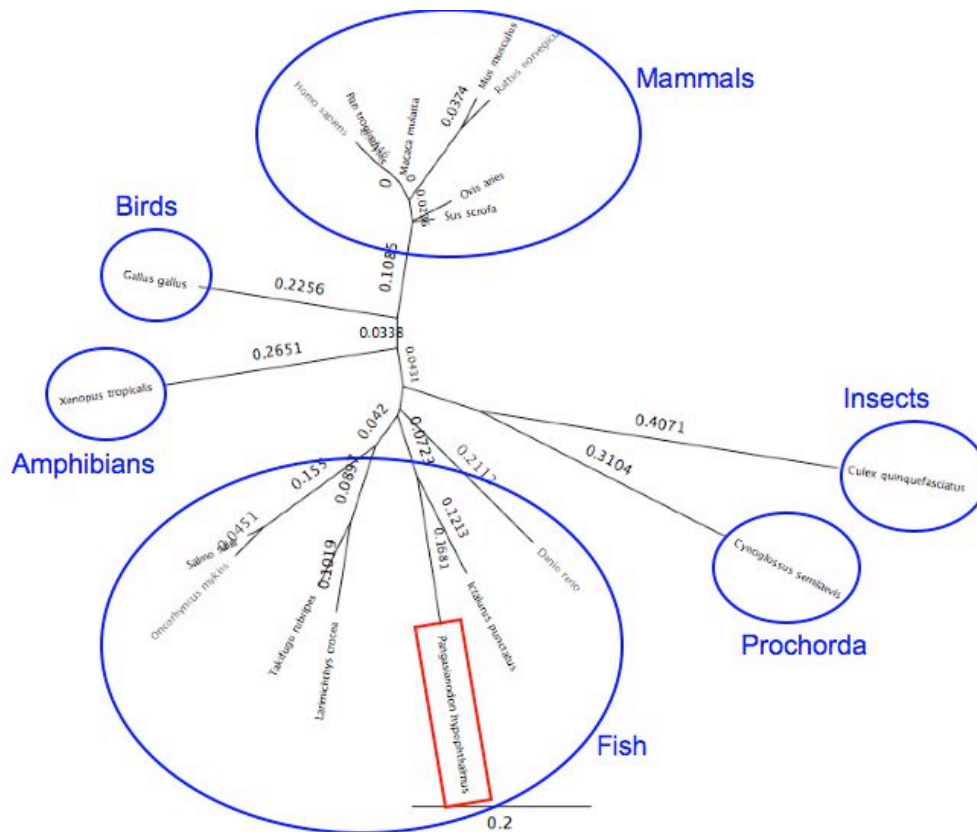
2°) Séquençage des gènes d'intérêt

Les différentes séquences obtenues ont été blastées dans NCBI et ont montré une forte homologie avec la séquence MyD88 d'*Ictalurus punctatus* (Score maximum : 655 ; e-value : 0,0 ; maximum d'identité : 92 %), un poisson-chat américain appartenant au même ordre que notre espèce (Siluriformes). L'alignement a généré une séquence consensus (450 bp), présentée au **Tableau 15**. Un arbre phylogénétique a aussi été réalisé dans le but de replacer la séquence MyD88 de *P. hypophthalmus* dans l'arbre évolutif de ce gène chez les Metazoa (**Figure 32**).

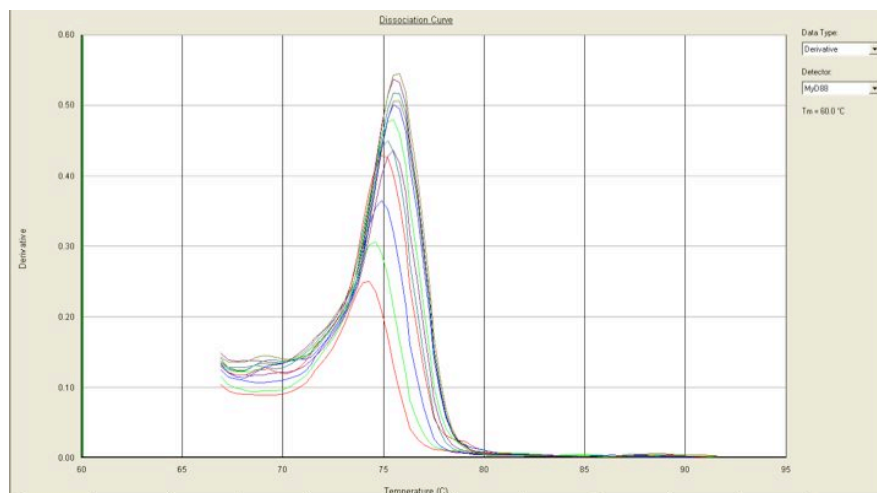
Nous retrouvons ici aussi le lien de parenté avec *I. punctatus*.

d. Quantification de l'expression des gènes d'intérêts

Etant donné le temps imparti, nous n'avons pas pu réaliser l'expérience dans son entièreté. Nous avons néanmoins pu montrer que le gène ménage 16S rRNA (utilisé pour la normalisation des résultats) ne convenait pas pour la quantification de MyD88 chez *P. hypophthalmus*. Le primer utilisé pour MyD88 (**Tableau 14**) semblerait donner des résultats concluants, comme l'indique le pic de la courbe de fusion observé à la **Figure 33**.



**Figure 32. Arbre phylogénétique du gène de MyD88 pour différentes espèces de Metazoa. Les distances estimées reposent sur le principe de Neighbor-joining et le modèle des distances génétiques est celui de Tamura-Nei. Espèces utilisées : *Culex quinquefasciatus* (XM001868586), *Cynoglossus semilaevis* (FJ641054), *Danio rerio* (AAH83419), *Gallus gallus* (NP001026133), *Gorilla gorilla* (AB446473), *Homo sapiens* (NM002468), *Ictalurus punctatus* (EU708325), *Lamirichthys crocea* (EU978950), *Macaca mulatta* (NM001130681), *Mus musculus* (NM010851), *Oncorhynchus mykiss* (NM01124421), *Ovis aries* (NM001166183), *Pan troglodytes* (NM001130463), *Pongo pygmaeus* (AB446474), *Rattus norvegicus* (AY191270), *Salmo salar* (EF672332), *Sus scrofa* (NM001099923), *Takifugu rubripes* (NM001113195), *Xenopus tropicalis* (NM001016837).**



**Figure 33. Courbe de fusion du primer MyD88 (Q-PCR).**

## V. DISCUSSION

Cette partie reprend brièvement l'ensemble des résultats présentés précédemment et les replace dans le contexte des connaissances scientifiques actuelles. Pour rappel, les objectifs de cette étude sur l'immunostimulation de *P. hypophthalmus* étaient : 1°) d'évaluer jusqu'à quel point les immunostimulants peuvent améliorer la réponse immunitaire chez *P. hypophthalmus* et réguler l'expression des TLR, 2°) de vérifier si les immunostimulants peuvent protéger *P. hypophthalmus* contre les pathogènes, 3°) d'évaluer la durée effective de cette protection.

### 1. Réponse au stress

Le stress, ou syndrome général d'adaptation, peut être défini comme étant le phénomène se produisant lors de perturbations imprévisibles de l'environnement, en dehors des modifications prévisibles apparaissant durant une journée, une saison, ... (Eckert et al., 2004).

Un des paramètres généralement utilisés pour évaluer la réponse au stress chez les poissons est le dosage du cortisol.

Dans notre expérience, nous avons vu que le cortisol augmentait avec le temps : les concentrations sont de 101 ng/mL de plasma pour les poissons sans période de repos et de 128 ng/mL de plasma pour les poissons avec période de repos. Plusieurs études font état de la grande variabilité dans les niveaux de cortisol chez les poissons : de 20 à 300 ng/mL (Acerete et al. 2007; Stolte et al. 2008), y compris chez la barbus de rivière (*Ictalurus punctatus*), pour laquelle Gil-Barcellos *et al.* (2006) observent des valeurs de cortisol allant de 30 à 309 ng/mL chez des poissons stressés. La littérature nous renseigne que les niveaux de cortisol circulant varient de manière saisonnière et journalière (**Tableau 16**), le degré de cette variation dépendant du stress induit et de la durée du stress (aigu ou chronique), mais aussi en fonction de l'espèce étudiée, des individus et de leur état de développement (œufs, alevins, immatures, adultes), comme du protocole mis en œuvre (Espelid et al. 1996). Il est important de noter que certains auteurs ont observé une acclimatation à l'état de stress (dans le cas d'un stress chronique, auquel on peut assimiler les conditions d'élevage en aquaculture) avec une réduction des effets suppressifs du



**Tableau 16. Concentrations en cortisol plasmatique chez différentes espèces de poissons soumis à différents types de stress (Martinez-Porchas et al. 2009).**

Species	Stressor	Cortisol (nmol/l)		Exposure	References
		Prestress	Poststress		
Atlantic char <i>Salvelinus alpinus</i>	Handling	5	449	Acute	Lyytikäinen <i>et al.</i> (2002)
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	Sea lice challenge	99	339	Chronic	Bowers <i>et al.</i> (2000)
Atlantic salmon (diploid) <i>Salmo salar</i>	Confinement	27	151	Acute	Sadler <i>et al.</i> (2000b)
Atlantic salmon (triploid) <i>Salmo salar</i>	Confinement	27	124	Acute	Sadler <i>et al.</i> (2000b)
Brook trout (diploid) <i>Salvelinus fontinalis</i>	Handling and confinement	19	242	Acute	Benfey & Biron (2000)
Brook trout (triploid) <i>Salvelinus fontinalis</i>	Handling and confinement	2	146	Acute	Benfey & Biron (2000)
Common carp <i>Cyprinus carpio</i>	Density	19	206	Acute	Ruane <i>et al.</i> (2002)
Pallid sturgeon	Confinement	5	16	Acute	Barton <i>et al.</i> (2000)
Scaphirhynchus albus					
Pallid sturgeon <i>Scaphirhynchus albus</i>	Handling	5	8	Acute	Barton <i>et al.</i> (2000)
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Chemical exposure	49	110	Chronic	Benguira <i>et al.</i> (2002)
Rainbow trout (diploid) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Handling and confinement	77	698	Acute	Benfey & Biron (2000)
Rainbow trout male <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trapping	16	380	Acute	Clements <i>et al.</i> (2002)
Rainbow trout female <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trapping	57	764	Acute	Clements <i>et al.</i> (2002)
Sea bream <i>Sparus aurata</i>	Crowding	13	358	Chronic	Ortuño <i>et al.</i> (2001)
Walleyes <i>Stizostedion vitreum</i>	Capture and transport	33-315	380-480	Acute	Barton <i>et al.</i> (2003)

cortisol (Mommsen et al. 1999; Caruso et al. 2005). Cette acclimatation se traduirait soit par une augmentation du taux d'évacuation des corticostéroïdes (Metabolic Clearance Rate, MCR) (Mommsen et al. 1999), soit par un rétrocontrôle (feed-back négatif) du cortisol sur l'axe HPI (Fast et al. 2008). De nouveau, le MCR dépend fortement de l'espèce utilisée, comme le montrent Mommsen *et al.* (1999) : 45 mL cortisol/kg/h chez l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*), 270 mL/kg/h chez le saumon sockeye (*Oncorhynchus nerka*), 449 mL/kg/h chez le corbeau de mer (*Hemitripterus americanus*). Cependant, une acclimatation à un stress chronique n'empêche pas une réponse physiologique (augmentation des valeurs de cortisol plasmatique) face à un stress aigu ultérieur, comme le montrent Gil-Barcellos *et al.* (2006) chez le poisson-chat d'Amérique du Sud (*Rhamdia quelen*).

*A priori*, ni le LPS, ni la présence de bactéries n'influencent de manière significative les niveaux de cortisol, excepté pour deux cas : au sein des poissons-contrôles T1 (après 7 jours de challenge), où 0,5 mg LPS/kg entraîne une augmentation de la concentration en cortisol (179 ng/mL), de même qu'au sein des poissons-contrôles T2 (après 14 jours de challenge), où le traitement à 5 mg LPS/kg entraîne une augmentation des valeurs de cortisol (173 ng/mL). Il est à noter que les concentrations en cortisol ne sont pas significativement différentes entre ces deux doses de LPS. Les poissons étant assez peu sensibles au LPS (Guttvik et al. 2002), les concentrations seuils impliquées pour stimuler l'axe HPI excèdent très largement celles requises pour l'axe HPA (Hypothalamus-Hypophyse-Surrénales) des mammifères (Acerete et al. 2007). Cependant, il semblerait que de fortes doses de LPS (supérieures à 200 mg/kg) stimulent spécifiquement l'activité sécrétoire de l'axe HPI, notamment la synthèse et la libération de *Corticotrophin Releasing Hormone* (CRH) par l'hypothalamus, activant de ce fait la libération d'*Adrenocorticotrophin Hormone* (ACTH) par l'hypophyse et la synthèse de glucocorticoïdes (cortisol principalement) (Acerete et al. 2007; Martinez-Porchas et al. 2009). Malagoli *et al.* (2004) montrent en effet que les taux de précurseur proCRH libérés par le système nerveux central augmentaient avec une exposition d'individus de barbotte brune (*Ameiurus nebulosus*) à 5 mg LPS/mL. En outre, la stimulation du système immunitaire par le LPS entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs glucocorticoïdes GR1 et GR2 (Stolte et al. 2008). En effet, chez la carpe commune

(*Cyprinus carpio*), Stolte *et al.* (2008) mettent en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs GR1 et GR2, respectivement jusqu'à 4 et 2 heures après injection de 50 µg LPS/mL de sang. Chez la dorade royale (*Sparus aurata*), Acerete *et al.* (2007) observent une augmentation de l'expression de GR dans la rate 12 heures après l'injection de 4 mg/kg de LPS et une augmentation des concentrations en cortisol plasmatique 2 heures après l'injection (avec 300 ng/mL après 2 heures et un pic à 525 ng/mL après 6 heures), retournant à leur niveau basal 48 heures après la stimulation (moins de 20 ng/mL). Cette réponse est semblable au pattern suivi par une réponse aiguë à un stresser classique. L'augmentation de la dose de 4 mg/kg de LPS à 8 mg/kg ne produit pas de changements significatifs, suggérant un seuil à l'effet du LPS. Une concentration de 80 µg/kg de LPS est trop faible que pour induire une réponse de stress. Des études similaires montrent les mêmes effets chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), avec une augmentation des taux de cortisol plasmatique 3 et 8 heures après injection. Par contre, Weber *et al.* (2005) montrent le contraire chez *I. punctatus*. Les concentrations en cortisol plasmatique ne sont pas altérées (22,8 ng/mL de sang), quel que soit le temps de prélèvement (sur une durée de 24 heures) après injection de 1,5 mg LPS/kg. La différence de réponse au stress entre les différentes espèces, incluant les observations de notre propre expérience, indique une réponse physiologiquement différente au sein des poissons. Il se peut aussi que les poissons-chats (ordre des Siluriformes) soient moins sensibles au LPS que les Salmoniformes et les Perciformes, et donc requièrent de plus fortes doses pour éliciter une réponse au cortisol.

Un autre paramètre utilisé dans l'évaluation de la réponse au stress chez les poissons est le taux de glucose.

Les concentrations en glucose diminuent au cours de l'expérience, puisque les poissons avec période de repos présentent des concentrations moins élevées en glucose (682 µg/mL) que les poissons sans période de repos (1172 µg/mL). Du point de vue des effets physiologiques, ces valeurs peuvent être mises en corrélation avec les valeurs observées en cortisol plasmatique. En effet, le cortisol est connu pour affecter le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (Mommensen *et al.* 1999). Des études réalisées chez les mammifères, et confirmées chez les poissons (Teleostei principalement), ont démontré

**Tableau 17. Concentrations en glucose plasmatique chez différentes espèces de poissons soumis à différents types de stress (Martinez-Porchas et al. 2009).**

Species	Stressor	Glucose (mmol/l)		Exposure	References
		Prestress	Poststress		
Atlantic cod <i>Gadus morhua</i>	Nitrite exposure	0.17	0.23	Chronic	Siikavuopio & Sæther (2006)
Bald notothen <i>Pagothenia borchgrevinki</i>	Temperature	4.5	10	Chronic	Lowe & Davison (2005)
Channel catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	Handling	1.7	2.8	Acute	Welker et al. (2007)
Coral trout	Capture and handling			Chronic	Frisch & Anderson (2005)
<i>Plectropomus maculatus</i>		1.6	7.9		
<i>Plectropomus leopardus</i>		1.9	7.4		
Emerald rockcod <i>Trematomus bernacchii</i>	Temperature	1.5	7.5	Chronic	Lowe & Davison (2005)
Matrinxã <i>Brycon amazonicus</i>	Handling and transportation	2.8	10	Acute	Urbinati & Carneiro (2006)
Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>	Electroshock	2.2	6.4	Acute	Barreto & Volpato (2006)
Nile tilapia	Social stressor	1.9	6.7	Acute	Barreto & Volpato (2006)
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pollutant	4.2	9	Acute	Miller et al. (2007)
Rainbow trout	Copper and air exposure	5.1	7.2	Chronic/Acute	Gagnon et al. (2006)
Sunshine bass <i>Morone chrysops x saxatilis</i>	Temperature and confinement	6.1	10.5	Chronic/Acute	Davis & Peterson (2006)
White sturgeon <i>Acipenser transmontanus</i>	Air exposure	1.6	1.7	Acute	Zuccarelli et al. (2008)

que les corticostéroïdes modulent le métabolisme du glucose. Ainsi, Inui & Yokote (1975) ont montré que, chez l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*), le cortisol permettait la production de glucose hépatique *de novo* via la néoglucogenèse, principalement au départ d'acides aminés. Effectivement, ils ont observé que le cortisol régule l'activité d'enzymes clés de cette réaction : glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-biphosphatase 1 et phosphoénolpyruvate carboxykinase. L'augmentation de glucose hépatique est aussi le résultat de la glycogénolyse du glycogène (mobilisation des réserves énergétiques) via l'activité permissive du cortisol (activation indirecte) sur des régulateurs hormonaux de cette réaction : (nor)adrénaline et glucagon principalement (Barton et al. 1987; Fast et al. 2008). Il est à noter qu'une augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse hépatique ne s'accompagne pas nécessairement d'une élévation en glucose plasmatique, sans doute à cause de l'important turn-over de ce métabolite (utilisation rapide par l'organisme en état de stress) (Mommensen et al. 1999). En effet, les études sur le sujet présentent des résultats parfois forts variables, le glucose plasmatique et le glycogène hépatique chez le poisson pouvant varier (augmentation, diminution ou *status quo*), en fonction de l'espèce, du stade de développement de l'individu, de l'état physiologique et métabolique de l'individu et de son exposition au cortisol (**Tableau 17**) (McDonald and Wood 2004).

Il semblerait que la période d'échantillonnage et l'injection bactérienne influencent les concentrations en glucose plasmatique. En effet, nous avons montré que les taux de glucose circulant diminuaient au temps T1 et T2 (respectivement 843 et 839 µg/mL) par rapport au poissons-contrôles T0 (996 µg/mL). De plus, après 14 jours de challenge, les taux de glucose sont plus élevés chez les poissons-tests (1034,19 µg/mL) que chez les poissons-contrôles (839 µg/mL). Les fortes concentrations en glucose observées peuvent être dues à la mobilisation des réserves énergétiques pour pallier à l'état de stress induit par l'injection bactérienne.

## **2. Effets du LPS sur la réponse immunitaire**

L'influence du LPS sur le système immunitaire est mesurée par l'intermédiaire de deux paramètres de l'immunité : l'activité du lysozyme (réponse innée) dans le plasma et dans la rate et le titre d'Ig plasmatiques (réponse adaptative).

Il semblerait que le LPS ait une influence sur les concentrations en lysozyme dans la rate. En effet, celles-ci sont inférieures pour les poissons ayant subi une période de repos (1419 u/mL) par rapport à ceux sans période de repos (1605 u/mL) lorsqu'ils sont nourris avec 0,5 mg LPS/kg. De même, au sein des poissons ayant subi une période de repos, les concentrations sont inférieures chez les poissons ayant été nourris avec 0,5 mg LPS/kg (1419 u/mL) par rapport à ceux ayant été nourris avec 0 mg LPS/kg (1598 u/mL). Il n'y a par contre aucun effet du LPS lorsque sa concentration est portée à 5 mg LPS/kg (1523 u/mL). On peut donc supposer que le LPS a un effet sur l'activité du lysozyme chez les poissons. Paulsen *et al.* (2001, 2003) ont montré que le LPS influence les concentrations en lysozyme chez le saumon atlantique (*Salmo salar*), *in vitro* d'une part, et *in vivo* d'autre part. Il faut savoir que le gène codant pour le lysozyme (LYSC) est continuellement activé à un niveau d'expression basal relativement bas chez les lignées cellulaires progénitrices et relativement haut chez les leucocytes matures (macrophages principalement). Le LPS a pour effet d'augmenter la transcription de ce gène. *In vitro*, une culture de macrophages de *S. salar* stimulée avec des concentrations croissantes de 0 à 250 µg LPS/mL voyait s'accroître l'activité du lysozyme. L'accroissement de l'activité du lysozyme est stable après 3 jours, alors qu'après 6 jours, un pic d'activité est atteint pour 10 µg LPS/mL. Soit le LPS active directement la transcription du gène du lysozyme, soit il entraîne la différenciation ou maturation des macrophages. De plus, le LPS est connu pour stimuler la sécrétion de cytokines IL-1-like et de TNFα, pouvant participer à la stimulation autocrine de synthèse de lysozyme (Paulsen et al. 2001). *In vivo*, l'activité du lysozyme plasmatique augmente 2 jours après injection de 30 mg LPS/kg, et continue à augmenter après 21 jours, excepté dans le foie. Le LPS a une action systémique sur la synthèse de lysozyme, puisqu'on en retrouve dans de nombreux tissus et organes : sang, foie, rate, rein, branchies, et tractus digestif (Paulsen et al. 2003). Enfin, Kubilay et Uluköy (2002) ont montré que, chez *Oncorhynchus mykiss*, des poissons soumis à un stress présentent des valeurs élevées de lysozyme en même temps que des valeurs élevées de cortisol et de glucose plasmatiques. Malgré les différentes observations qui ont pu être réalisées chez des poissons injectés ou nourris avec du LPS, de nombreuses études tendent à montrer que certains poissons, comme les Salmonidae, sont insensibles à ce *Pathogen*

*Associated Molecular Pattern* (PAMP) particulier, soit parce qu'il est absorbé par la circulation et évacué rapidement (Guttvik et al. 2002), soit parce qu'il ne parvient pas à passer la barrière entérique, ou en très faibles quantités (dus à la destruction de la molécule dans le tractus digestif) (Selvaraj et al. 2009). Néanmoins, certaines études montrent que de petites quantités de LPS parvenaient à activer certaines réactions du système immunitaire, comme l'activation non spécifique des macrophages (principaux leucocytes libérateurs de lysozyme) et la synthèse d'immunoglobulines spécifiques par les lymphocytes B (Guttvik et al. 2002).

Bien que nous n'observions pas d'influence significative des doses de LPS sur les taux d'Ig, la réponse aux antigènes par production d'anticorps spécifiques a été démontrée chez de nombreuses espèces de poissons. Par exemple, *Salmo salar* est capable de contrer une attaque de *Vibrio anguillarum* ou de *V. salmonicida* via la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre le LPS (alors que l'immunité innée est activée par le lipide A – extrémité hydrophobe membranaire du LPS –, il a été montré que c'est la chaîne O – extrémité hydrophile extracellulaire – qui est responsable de l'activation de l'immunité adaptative – anticorps anti-O) (Lund et al. 2006; Selvaraj et al. 2009). Il en est de même chez d'autres espèces, comme *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio*, *Anguilla japonica*, le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*), la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), le loup tacheté (*Anarhichas minor*) et le flétan (*Hippoglossus hippoglossus*) (Schroder et al. 2009; Selvaraj et al. 2009). Les anticorps sont capables de reconnaître plusieurs épitopes du LPS, avec des sensibilités et des combinaisons différentes. Cependant, il semblerait qu'il existe une tolérance au LPS administré oralement (Guttvik et al. 2002), comme l'atteste l'étude de Selvaraj *et al.* (2009) sur les taux d'Ig produits en réaction à une administration de LPS chez *C. carpio*.

En fin de compte, le LPS peut présenter des effets très divers sur les organismes, tant du point de vue des doses impliquées que de la réponse au stress ou de la réponse immunitaire. Celles-ci varient aussi en fonction des espèces de poissons utilisées, de la forme du PAMP (LPS seul ou bactérie entière) et de son mode de pénétration dans l'organisme (injection ou voie orale).

### **3. Effets du challenge test sur la réponse immunitaire**

L'influence de l'infection bactérienne sur le système immunitaire est mesurée par l'intermédiaire de deux paramètres de l'immunité : l'activité du lysozyme (réponse innée) dans le plasma et dans la rate et le titre d'Ig plasmatiques (réponse adaptative). Les effets d'un challenge test doivent aussi être replacés dans le contexte de la mortalité.

Concernant la mortalité chez les poissons-tests, il semblerait qu'il y ait un effet temps : la mortalité est plus faible chez les poissons avec période de repos (7,9 %) que sans période de repos (32,8 %). Cela pourrait être dû à une imprécision dans les volumes de bactéries injectés entre le premier et le deuxième challenge (précision pour un facteur  $10^3$ ). La variation de concentration en LPS ne semble pas avoir d'effet sur la mortalité. Les conditions stressantes évoquées plus haut dans la partie « résultats » ne semblent pas avoir affecté significativement la mortalité des poissons-contrôles. Cela ne signifie néanmoins pas que les indicateurs de stress et les paramètres de l'immunité présentent des valeurs semblables à celles de poissons élevés dans des conditions non stressantes.

Les concentrations en lysozyme plasmatique diminuent au cours du temps : 604 u/mL pour les poissons sans période de repos contre 542 u/mL pour les poissons avec période de repos. Ceci pourrait s'expliquer par une tolérance au stress, comme nous avons pu le voir pour la mesure du cortisol plasmatique. Par contre, au sein des périodes d'échantillonnages (T0, T1 et T2, avec ou sans période de repos), les poissons-tests présentent des concentrations en lysozyme, à la fois dans le plasma et dans la rate, au temps T1, supérieures à celles des poissons-contrôles T0 et T1. Les bactéries semblent affecter ce paramètre à court terme, étant donné qu'au temps T2, il n'y a plus de différence significative visible entre les poissons-tests T2 et les poissons-contrôles T2 ou T0. Les différences entre les valeurs de lysozyme dans le plasma et dans la rate sont en accord avec la littérature, puisque l'activité du lysozyme est organe-dépendant (Subbotkina and Subbotkin 2003). De plus, il semblerait en effet qu'un challenge bactérien stimule l'activité du lysozyme à court terme : Bilodeau *et al.* (2006) ont montré que, chez *I. punctatus* et le poisson-chat bleu (*Ictalurus furcatus*), celle-ci atteint un pic 5



jours après le début du challenge, pour retourner à son niveau initial 9 jours après, avec cependant des variations lorsque l'on compare différentes populations (susceptibilité différente en fonction des variations génétiques intraspécifiques) (Bilodeau-Bourgeois et al. 2008).

Le titre d'Ig plasmatique augmente avec le temps : 12870 mg/mL pour les poissons sans période de repos et 19347 mg/mL pour les poissons avec période de repos. Lors d'une absence de période de repos, le titre d'Ig diminue en T1 (7024 mg/mL) par rapport au T0 (15670 mg/mL), mais remonte pour ne plus présenter de différence significative en T2 (17128 mg/mL), lorsqu'il y a injection bactérienne. Il semblerait que l'influence des bactéries soit limitée dans le temps, peut-être grâce à une amélioration du système immunitaire vis-à-vis de la prise en charge de cette attaque de pathogènes. Lors d'une période de repos, on observe une augmentation des concentrations en Ig pour les poissons-contrôles au temps T1 (22172 mg/mL) et T2 (21680 mg/mL) par rapport au T0 (14862 mg/mL), les bactéries n'ayant apparemment pas d'influence (pas de différences entre les poissons-contrôles et les poissons-tests au sein d'une même période d'échantillonnage). Plusieurs études montrent que le déclenchement d'une réponse au stress entraîne généralement une inhibition de la réponse immunitaire (immunosuppression), dans le but d'éviter à l'organisme les conséquences d'effets délétères d'une réponse proinflammatoire trop importante (Stolte et al. 2008), par inhibition de certains facteurs de transcription (comme NF- $\kappa$ B, un des messagers finaux de la transduction du signal via la voie d'activation TLR-dépendante) (Fast et al. 2008). Dans cette optique, la réponse au stress réduit la réponse phagocytaire, la mitogenèse, le nombres de lymphocytes B circulants, la production d'immunoglobulines circulantes (IgM principalement) et la résistance aux pathogènes (Cuesta et al. 2006; Stolte et al. 2008), ainsi que la mort cellulaire programmée (apoptose) des lymphocytes de tous les organes (Saha et al. 2004). Ainsi, Espelid *et al.* (1996) observent que, chez le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) et *I. punctatus*, le cortisol a un effet suppressif sur les lymphocytes B du pronéphros et de la rate (et donc, sur le taux d'Ig plasmatiques). De plus, il semblerait que les lymphocytes B soient par la suite incapables d'engager une mitogenèse sous stimulation au LPS, aussi bien chez *Salmo salar* que chez *I. punctatus*.

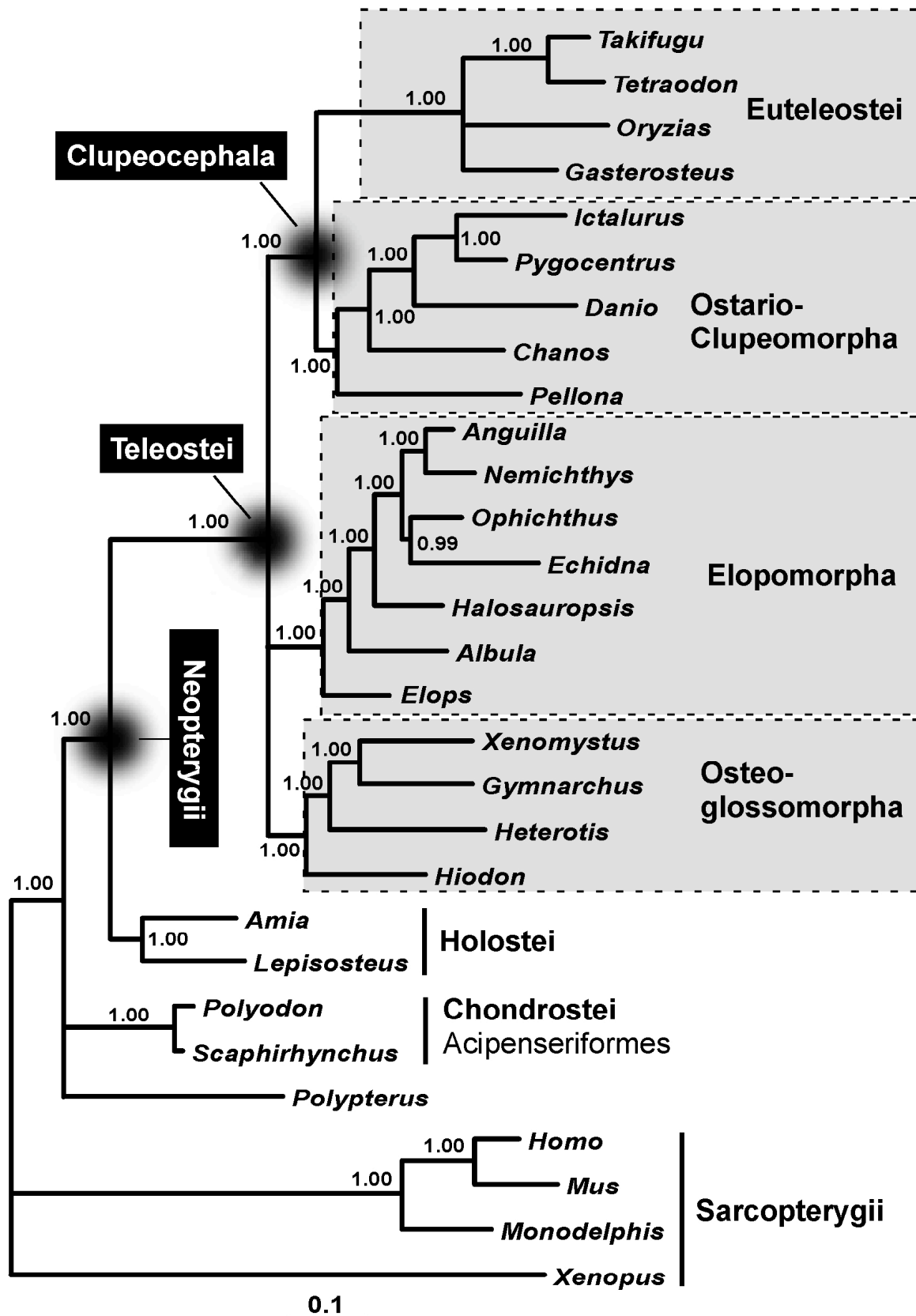


Figure 34. Phylogénie des Clupeocephala (troisième groupe de poissons Teleostei) (Orti and Li 2009).

(Ellsaesser and Clem 1987). Il apparaîtrait dès lors que le cortisol affecte ou interfère avec les récepteurs de la mitogenèse des lymphocytes B. Cependant, Bilodeau *et al.* (2006) ont montré que, lors d'un challenge test avec *Edwardsiella ictaluri*, *I. punctatus* était capable de produire des anticorps, mais que leur concentration n'était pas corrélée à l'intensité de l'infection.

#### 4. **Mesure de la régulation de l'expression des TLR et des molécules auxiliaires**

Concernant le choix des nombreux TLR ainsi que de divers motifs apparentés, il faut rappeler que les TLR participent à la détection des pathogènes et permettent d'activer la réponse immunitaire innée et, par coopération, adaptative. Il s'agit donc d'éléments centraux du système immunitaire.

Les primers de NF- $\kappa$ B n'ont pas pu être designés à cause d'un manque de séquences à aligner (la seule séquence complète disponible étant celle de *Danio rerio*). De même les primers TLR2 et 5 n'ont pas pu être designés, mais pour des raisons différentes. Concernant le TLR2, les différentes séquences alignées n'ont pas permis de dégager une séquence consensus, étant donné que les séquences présentaient une divergence trop importante entre les différentes espèces. Par contre, une séquence consensus a pu être générée à partir de l'alignement de séquences de TLR5, mais les primers designés par FastPCR<sup>®</sup> présentaient un degré trop important de dégénérescence pour être utilisés de manière convenable. En effet, des primers trop dégénérés pourraient entraîner le clonage d'autres séquences que celle d'intérêt par un manque de spécificité.

Parmi les autres primers testés, seuls ceux de MyD88 ont fonctionné. Cela peut s'expliquer par le fait que les primers (choisis pour être dégénérés au minimum) ont été designés à partir de poissons évolutivement éloignés de l'ordre des Siluriformes (Perciformes et Salmoniformes dans la majorité des cas). En effet, Orti & Li (2009) nous renseignent que les Siluriformes (*I. punctatus* et *P. hypophthalmus*) et les Cypriniformes (*D. rerio* et *C. carpio*) appartiennent au clade des Ostarioclupeomorpha (ou Otocephala), alors que les autres appartiennent au clade-frère des Euteleostei (ou Acanthomorpha), regroupant les Protacanthopterygii (Salmoniformes : *S. salar* et *O. mykiss*), au statut cependant contesté, et les Acanthopterygii (Perciformes : *L. crocea* et *S. aurata* ; Pleuronectiformes : *P. olivaceus* ; Tetraodontiformes : *T. rubripes*) (**Figure 34**).

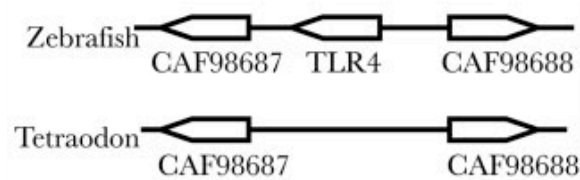


Figure 35. Synténie entre le génome de *Danio rerio* et celui de *Takifugu rubripes* au niveau du TLR4 (Roach et al. 2005).

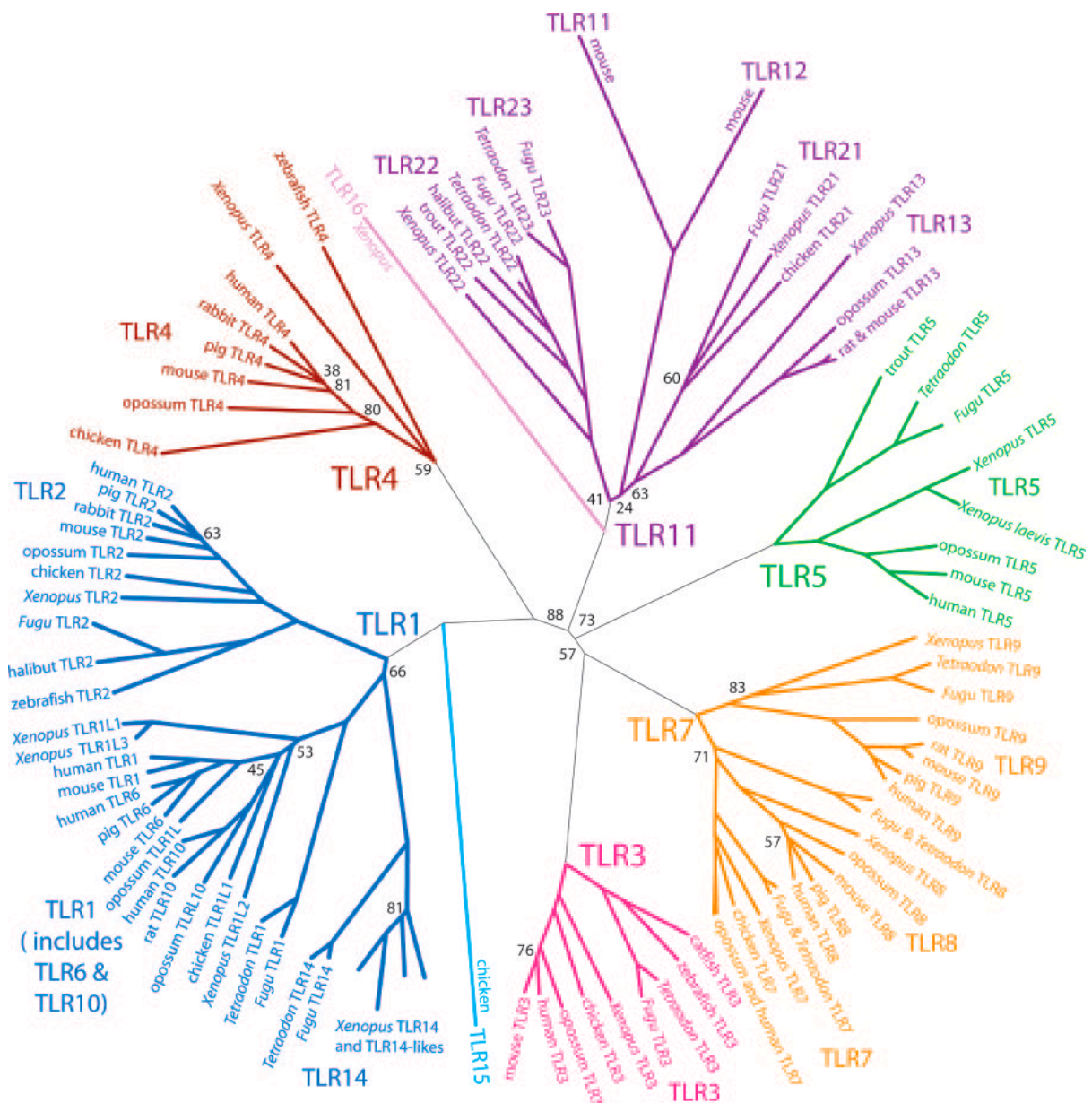


Figure 36. Phylogénie des 6 familles de TLR chez les Vertébrés (Roach et al. 2005).

L'investigation des TLR suite à une immunostimulation et à un challenge bactérien trouve tout son sens d'après ce que nous savons de l'activation de la réponse immunitaire. Néanmoins, dans cette expérience, nous n'avons pas tenté de mesurer l'expression du TLR4, qui est pourtant le récepteur attribué au LPS chez les mammifères et les oiseaux (Medzhitov and Janeway 2000b). Cela s'explique par le fait que les scientifiques ignorent encore si ce TLR existe chez les poissons. En effet, alors qu'il a pu être mis en évidence chez *D. rerio* (sous deux formes : TLR4a et TLR4b) et chez *Gobiocypris rarus*, il n'a en revanche pas pu être cloné chez *T. rubripes* (Iliev et al. 2005; Roach et al. 2005), ni chez *Tetraodon nigroviridis* et *Gasterosteus aculeatus* (Rebl et al. 2009). Cependant, il est possible que la séquence du gène de TLR4 se soit trouvée au niveau d'un gap et, de ce fait, n'ait pu être mise en évidence. Il est en tout cas évident, via l'utilisation de la synténie, que si TLR4 existe chez *T. rubripes*, il se trouve à la même place dans le génome que celui de *D. rerio*, étant donné que les gènes directement adjacents le sont (**Figure 35**) (Roach et al. 2005). Il n'est maintenant pas exclu que, chez les poissons, le LPS soit reconnu par un autre récepteur de type TLR. En effet, plusieurs études mettent en évidence une surexpression de certains TLR lors d'un challenge test impliquant une bactérie Gram- ou lors d'une injection de LPS. Ainsi, Baoprasertkul *et al.* (2007) ont montré une surexpression du TLR2 chez *I. punctatus* et *I. furcatus* lors d'un challenge test impliquant *E. ictaluri*. TLR2 est capable de reconnaître le LPS de certains pathogènes, comme *Porphyromonas gingivalis* et *Leptospira interrogans*. Une étude similaire rapporte le même fait chez le poulet (*Gallus gallus*) (Oshiumi et al. 2003). Wu *et al.* (2008) montrent, quant à eux, que c'est TLR1 qui est surexprimé dans la rate de *T. nigroviridis* lors d'une injection de LPS. La prise en charge de la reconnaissance du LPS par des TLR de la famille TLR1 n'est pas forcément très surprenante, étant donné la proximité génétique des familles TLR1 et TLR4 (**Figure 36**). Le mécanisme de sensing du LPS pourrait avoir évolué à partir d'un ancêtre commun à TLR2 et TLR4, ce dernier n'étant pas retenu au cours de l'évolution. Cette hypothèse est renforcée par le constat suivant : il semblerait en effet que l'ensemble des TLR présents chez tous les Vertebrata soit apparu il y a plus de 400 millions d'années, soit avant la séparation poissons-mammifères. Ceci signifie que l'ancêtre commun de ces deux groupes de Metazoa possédait un gène codant pour le TLR4 et que, lors de l'évolution de la lignée « poisson », celui-ci ait été perdu ou

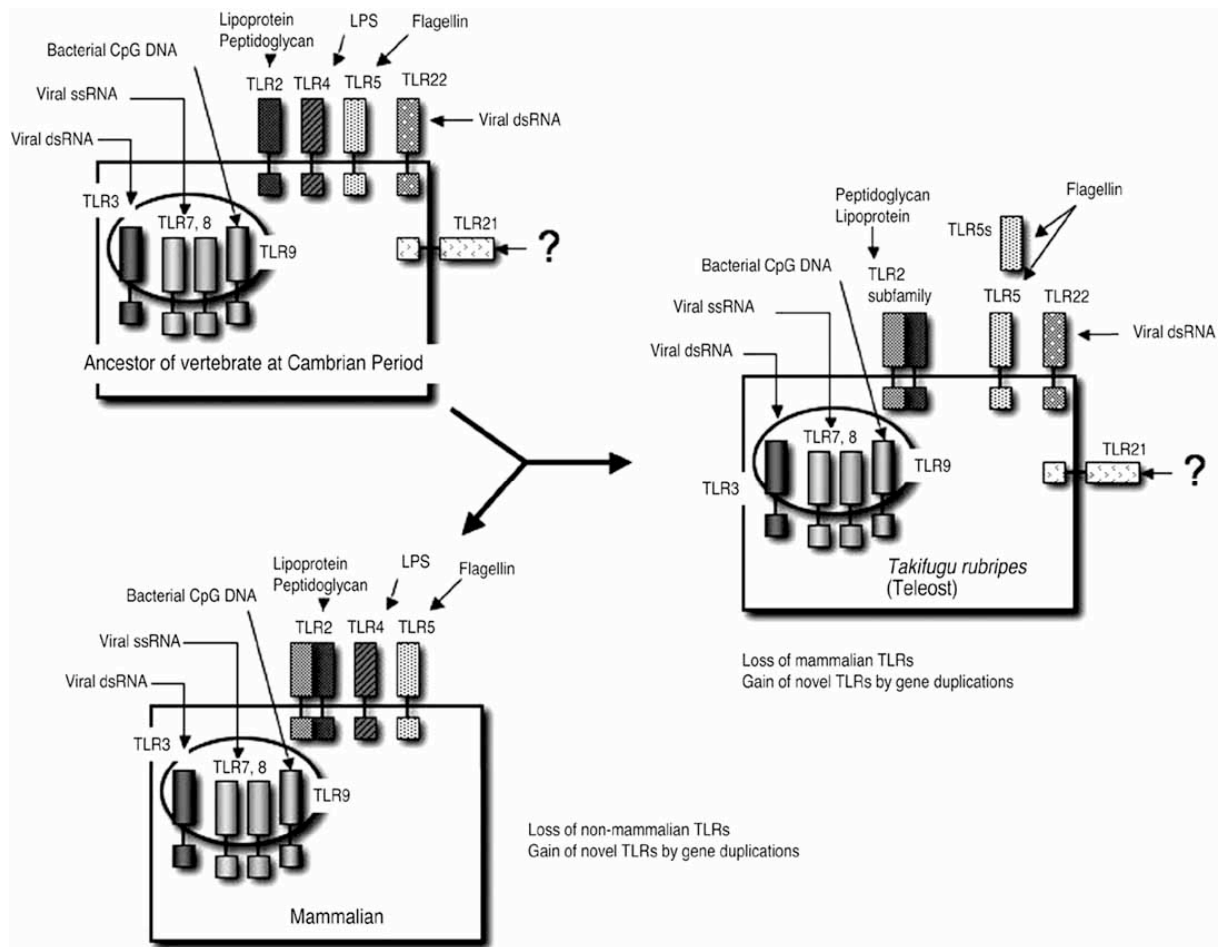


Figure 37. Evolution des familles de TLR chez les Vertébrés (Oshiumi et al. 2008).

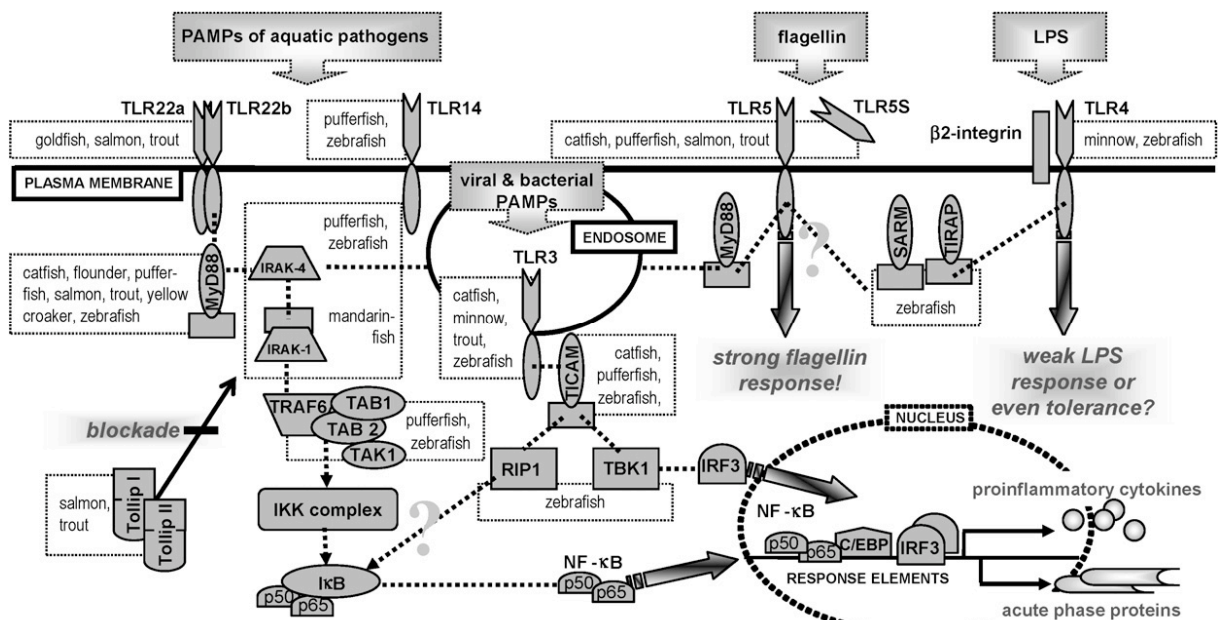


Figure 38. Voies de signalisation de certains TLR particuliers chez les poissons (Rebl et al. 2009).

inactivé sous forme d'un pseudogène, au moins après la séparation des clades-frères des Ostarioclupeomorpha et des Euteleostei (**Figure 37**). L'hypothèse est renforcée par l'étude de Baoprasertkul *et al.* (2007) qui montre que le gène de TLR2 chez *I. punctatus*, *D. rerio* et *Homo sapiens* ne comporte qu'un seul exon, alors que ce n'est pas le cas chez *T. rubripes* et le cardeau (*Paralichthys olivaceus*). Et il en serait de même pour une série d'autres gènes présents chez les poissons et absents chez les mammifères, comme les TLR21 et 22 (Oshiumi *et al.* 2003). Il se peut aussi que la détection de LPS soit médiée par des molécules accessoires, comme c'est le cas chez les mammifères avec la *LPS-binding Protein* (LBP), CD14 et LY96 (ces trois molécules n'ont pas pu être mises en évidence chez les poissons). Ainsi, Iliev *et al.* (2005) ont émis l'hypothèse que le LPS réagirait avec des  $\beta$ 2-intégrines, et qu'il pourrait utiliser une voie de signalisation particulière (**Figure 38**). Il se pourrait aussi que ce soit CD180 qui prenne en charge le LPS, CD180 étant phylogénétiquement proche de TLR4 (**Figure 39**).

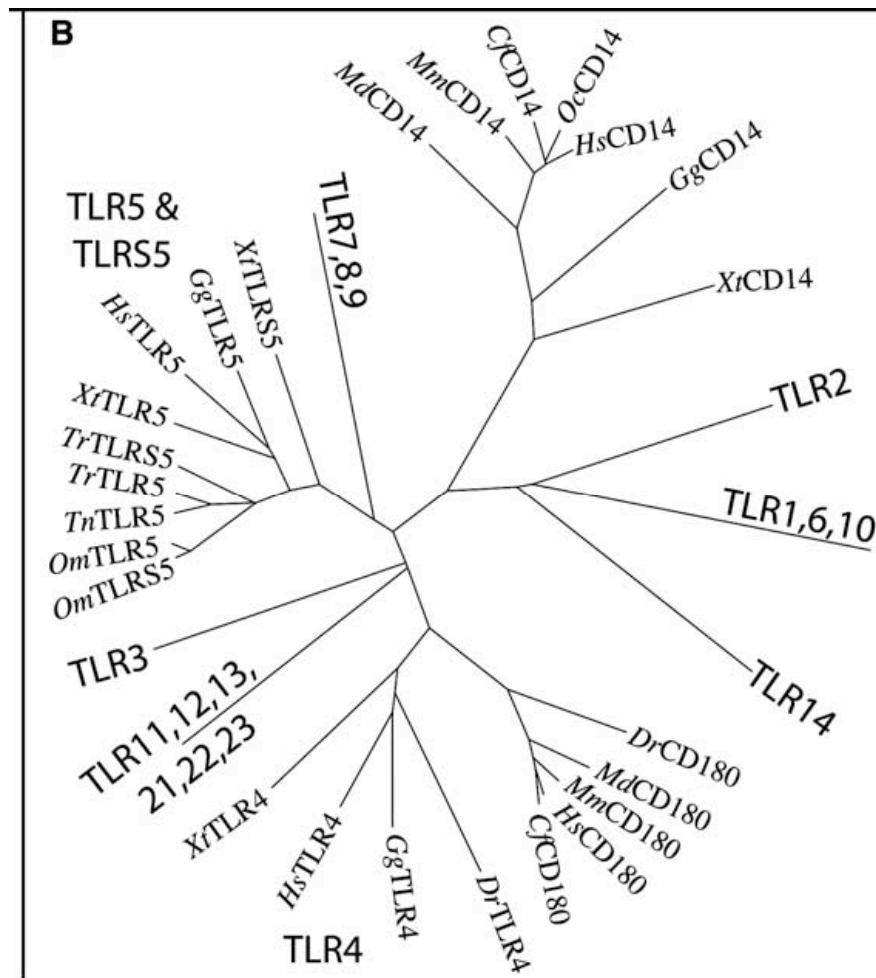


Figure 39. Phylogénie des TLR chez les Vertébrés, présentant le lien de parenté entre TLR4 et CD180 (Iliev et al. 2005).



## VI. CONCLUSION

*Pangasianodon hypophthalmus* est un poisson-chat asiatique économiquement très important et soumis au risque bien connu en aquaculture que sont les infections bactériennes (*Edwardsiella ictaluri* dans le cas présent). C'est pourquoi nous nous sommes penchés, dans ce travail, sur les effets des immunostimulants sur la réponse immunitaire et la régulation de l'expression des TLR. Comme tous les poissons Teleostei, *P. hypophthalmus* présente lors d'une attaque de pathogène une réponse immunitaire innée et adaptative, la première étant largement prédominante. Cette réponse ne peut être activée que par la reconnaissance préalable du pathogène par des récepteurs cellulaires, dont la famille la plus importante est celle des *Toll-like Receptors* (TLR). Ceux-ci sont capables de reconnaître toute une série de *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), dont le lipopolysaccharide bactérien (LPS), un constituant essentiel de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif. L'utilisation de cette molécule comme immunostimulant peut constituer une alternative à l'utilisation d'antibiotiques dans l'aquaculture de *P. hypophthalmus*. Dans cette optique, les objectifs de ce travail étaient : 1°) d'évaluer jusqu'à quel point les immunostimulants peuvent améliorer la réponse immunitaire chez *P. hypophthalmus* et réguler l'expression des TLR, 2°) de vérifier si les immunostimulants peuvent protéger *P. hypophthalmus* contre les pathogènes, 3°) d'évaluer la durée effective de cette protection. Au vu des résultats obtenus et des informations disponibles dans la littérature scientifique actuelle, le LPS ne semble pas améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire de *P. hypophthalmus* lors d'un challenge test avec *E. ictaluri*, et ne semble donc pas constituer une protection effective contre les pathogènes. Etant donné l'état non achevé de la manipulation concernant l'expression des TLR, nous ne pouvons pas conclure quand à l'action d'immunostimulants comme le LPS sur ceux-ci. Dans la perspective de futurs travaux sur les TLR et d'autres molécules de l'activation de l'immunité, il faudra retenir que les poissons semblent dépourvus de récepteurs spécifiques à cette molécule (TLR4 chez les mammifères et les oiseaux), bien qu'il existerait des voies alternatives (autres TLR ou molécules accessoires).

Cependant, étant donné la relative nouveauté de l'étude des substances immunostimulantes sur l'immunité, il nous paraît clair qu'il est nécessaire d'approfondir les recherches sur l'action des

immunostimulants sur le système immunitaire de *P. hypophthalmus*, notamment via de nouvelles voies de pénétration (injection intrapéritonéale, immersion) et l'utilisation d'autres substances (matériel héréditaire de type motifs CpG, glucanes, peptidoglucans, protéines telles que la flagelline, facteurs nutritionnels, hormones, cytokines, ...).

## **VII. BIBLIOGRAPHIE**

### **1. Ouvrages de référence**

- Anderson, D. P. 1977. Fish Immunology. TFH Publications, Hong Kong.
- Eckert, R., D. Randall, W. Burggren, and K. French. 2004. Physiologie animale. De Boeck Université, Bruxelles.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik. 2003. Immunobiologie. Le système immunitaire fondamental et pathologique. De Boeck Université, Bruxelles.
- Prescott, L., J. Harley, and D. Klein. 2003. Microbiologie. De Boeck Université, Bruxelles.
- Primrose, S.B., and R.M. Twyman. 2004. Principes de génie génétique. De Boeck Université, Bruxelles.
- Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 2002. Immunologie. De Boeck Université, Bruxelles.

### **2. Articles**

- Acerete, L., J. C. Balasch, B. Castellana, B. Redruello, N. Roher, A. V. Canario, J. V. Planas, S. MacKenzie, and L. Tort. 2007. Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) - Differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 148:32-43.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Alvarez-Pellitero, P. 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126:171-198.
- Aoki, T., T. Takano, M. D. Santos, H. Kondo, and I. Hirono. 2008. Molecular innate immunity in Teleost Fish: Review and future perspectives. *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress* 2008:263-276.

- Baoprasertkul, P., E. Peatman, J. Abernathy, and Z. J. Liu. 2007. Structural characterisation and expression analysis of toll-like receptor 2 gene from catfish. *Fish & Shellfish Immunology* 22:418-426.
- Barton, B. A., C. B. Schreck, and L. D. Barton. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress response in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 2:173-185.
- Bilodeau, A. L., B. C. Peterson, and B. G. Bosworth. 2006. Response of toll-like receptors, lysozyme, and IGF-I in back-cross hybrid (F1 male (blue X channel) X female channel) catfish challenged with virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology* 20:29-39.
- Bilodeau-Bourgeois, L., B. G. Bosworth, and B. C. Peterson. 2008. Differences in mortality, growth, lysozyme, and toll-like receptor gene expression among genetic groups of catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology* 24:82-89.
- Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J. L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschopp. 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *Journal of Biological Chemistry* 273:12203-12209.
- Caruso, G., L. Genovese, G. Maricchiolo, and A. Modica. 2005. Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquaculture International* 13:67-73.
- Chen, D., and A. J. Ainsworth. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Diseases* 15:295-304.
- Commission of Mekong River. 2002. Freshwater aquaculture in the Lower Mekong Basin. MRC Technical Paper:1-65.
- Corsin, F. 2008. Farmed Pangasius. WWF.
- Cremer, I. 2009. Récepteurs et médiateurs de l'immunité innée. Université Paris 6.
- Crumlish, M., T. T. Dung, J. F. Turnbull, N. T. N. Ngoc, and H. W. Ferguson. 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius*

hypophthalmus (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases* 25:733-736.

- Cuesta, A., R. Laiz-Carrión, F. Arjona, M. P. M. del Río, J. Meseguer, J. M. Mancera, and M. A. Esteban. 2006. Effect of PRL, GH and cortisol on the serum complement and IgM levels in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 20:427-432.
- Dung, T. T., G. Monti, and M. Crumlish. Undated. The importance of *Pangasius* farming in the Mekong Delta, Vietnam.
- Ellsaesser, C. F., and L. W. Clem. 1987. Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology* 87(2):405-408.
- Espelid, S., G. B. Lokken, K. Steiro, and J. Bogwald. 1996. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 6:95-110.
- Euzéby, J. P., J.-M. Bouvier, S. Heleu, and B. Perrossier. 2008. *Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire*.
- Fast, M. D., S. Hosoya, S. C. Johnson, and L. O. B. Afonso. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology* 24:194-204.
- Ferguson, H. W., J. F. Turnbull, A. Shinn, K. Thompson, T. T. Dung, and M. Crumlish. 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases* 24:509-513.
- Galindo-Villegas, J., and H. Hosokawa. 2004. Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish. *Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*:16-19.
- Gil-Barcellos, L. J. G., L. C. Kreutz, and R. M. Quevedo. 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundia (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* 253:317-321.
- Guttvik, A., B. Paulsen, R. A. Dalmo, S. Espelid, V. Lund, and J. Bogwald. 2002. Oral administration of lipopolysaccharide to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry.

Uptake, distribution, influence on growth and immune stimulation. *Aquaculture* 214:35-53.

- Hansen, J. D., and A. G. Zapata. 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews* 166:199-220.
- Ho, T. T., N. Areechon, P. Srisapoome, and S. Mahasawasde. Undated. Identification and antibiotic sensitivity test of the bacteria isolated from Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* [Sauvage, 1878]) in pond cultured in Vietnam.
- Hoffmann, K. 2007. Immunostimulation in aquaculture: What's the news? *AQUA Culture Asia-Pacific Magazine*:14-17.
- Huet, O., G. Choukroun, and J.-P. Mira. 2004. Toll like receptor, inflammatory response and sepsis. *Réanimation* 13:167-175.
- Huttenhuis, H. B. T., A. S. P. Ribeiro, T. J. Bowden, C. Van Bavel, A. J. Taverne-Thiele, and J. Rombout. 2006. The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 21:261-271.
- Iliev, D. B., J. C. Roach, S. Mackenzie, J. V. Planas, and F. W. Goetz. 2005. Endotoxin recognition: In fish or not in fish? *Febs Letters* 579:6519-6528.
- Inui, Y., and M. Yokote. 1975. Gluconeogenesis in the Eel - IV. Gluconeogenesis in the hydrocortison-administered Eel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 41(9):973-981.
- Janeway, C. A., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20:197-216.
- Jin, Z. 2004. Application of immunostimulants in larviculture. *Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific*.
- Kawai, T., and S. Akira. 2005. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Research & Therapy* 7:12-19.
- Kubilay, A., and G. Uluköy. 2002. The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Zool.* 26:249-254.
- Lee, M. S., and Y. J. Min. 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual Review of Biochemistry* 76:447-480.

- Lund, V., S. Bordal, O. Kjellsen, H. Mikkelsen, and M. B. Schroder. 2006. Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. *Developmental and Comparative Immunology* 30:1145-1155.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20:137-151.
- Malagoli, D., M. Mandrioli, and E. Ottaviani. 2004. ProCRH in the teleost *Ameiurus nebulosus*: gene cloning and role in LPS-induced stress response. *Brain Behavior and Immunity* 18:451-457.
- Martinez-Porchas, M., L. R. Martinez-Cordova, and R. Ramos-Enriquez. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4(2):158-178.
- Matsunaga, T., and A. Rahman. 1998. What brought the adaptative immune system to vertebrates? - The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunological Reviews*:177-186.
- McDonald, M. D., and C. M. Wood. 2004. The effect of chronic cortisol elevation on urea metabolism and excretion in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 174:71-81.
- Medzhitov, R., and C. Janeway. 2000a. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews* 173:89-97.
- Medzhitov, R., and C. Janeway. 2000b. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* 8:452-456.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Q. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell* 2:253-258.
- Miller, N., M. Wilson, E. Bengten, T. Stuge, G. Warr, and W. Clem. 1998. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological Reviews* 166:187-197.
- Mommsen, T. P., M. M. Vijayan, and T. W. Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:211-268.

- Nayak, S. K., P. Swain, P. K. Nanda, S. Dash, S. Shukla, P. K. Meher, and N. K. Maid. 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology* 24:394-399.
- Nonaka, M., and S. L. Smith. 2000. Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 215-228.
- Orti, G., and C. Li, eds. 2009. Chapter 1: Phylogeny and Classification. In *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Phylogeny, Reproductive System, Viviparity, Spermatozoa. B.MG. Jamieson Editor. *Reproductive Biology and Phylogeny*, vol. 8A. Enfield, New Hampshire.
- Oshiumi, H., T. Tsujita, K. Shida, M. Matsumoto, K. Ikeo, and T. Seya. 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* 54:791-800.
- Pandey, S., and D. K. Agrawal. 2006. Immunobiology of Toll-like receptors: Emerging trends. *Immunology and Cell Biology* 84:333-341.
- Paulsen, S. M., R. E. Engstad, and B. Robertsen. 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 11:23-37.
- Paulsen, S. M., H. Lunde, R. E. Engstad, and B. Robertsen. 2003. In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 14:39-54.
- Plouffe, D. A., P. C. Hanington, J. G. Walsh, E. C. Wilson, and M. Belosevic. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 12:266-277.
- Poitras, E., and A. Houde. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2(2):2-11.
- Poulsen, A., D. Griffiths, S. Nam, and T. T. Nguyen. 2008. Capture-based aquaculture of Pangasiid catfishes and snakeheads in the Mekong River Basin. *FAO Fisheries Technical Paper*.:69-91.
- Raa, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. *Avances en Nutricion Acuicola* V:47-56.



- Rebl, A., T. Goldammer, and H.-M. Seyfert. 2009. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* xxx:xxx-xxx.
- Roach, J. C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M. K. Purcell, K. D. Smith, L. E. Hood, and A. Aderem. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9577-9582.
- Roberts, T. R., and C. Vidthayanon. 1991. Systematic revision of the Asian catfish family Pangasiidae, with biological observations and descriptions of three new species. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.*:97-144.
- Robertsen, B., R. E. Ehgstad, and J. B. Jorgensen. 1994.  $\beta$ -glucan as immunostimulants in fish. *Modulators of Fish Immune Responses*:83-99.
- Ruane, N. M., S. E. W. Bonga, and P. H. M. Balm. 1999. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology* 115:210-219.
- Saha, N. R., T. Usami, and Y. Suzuki. 2004. In vitro effects of steroid hormones on IgM-secreting cells and IgM secretion in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology* 17:149-158.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172:63-92.
- Schluter, S. F., R. M. Bernstein, H. Bernstein, and J. J. Marchalonis. 1999. 'Big Bang' emergence of the combinatorial immune system. *Developmental and Comparative Immunology* 23:107-111.
- Schroder, M. B., T. Ellingsen, H. Mikkelsen, E. A. Norderhus, and V. Lund. 2009. Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. *Fish & Shellfish Immunology* 27:112-119.
- Selvaraj, V., K. Sampath, and V. Sekar. 2009. Administration of lipopolysaccharide increases specific and non-specific immune parameters and survival in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 286:176-183.

- Smith, P. 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 27:243-264.
- Steine, N. O., G. O. Melingen, and H. I. Wergeland. 2001. Antibodies against *Vibrio salmonicida* lipopolysaccharide (LPS) and whole bacteria in sera from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated during the smolting and early post-smolt period. Fish & Shellfish Immunology 11:39-52.
- Stolte, E. H., S. B. Nabuurs, N. R. Bury, A. Sturm, G. Flik, H. F. J. Savelkoul, and B. Kemenade. 2008. Stress and innate immunity in carp: Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. Molecular Immunology 46:70-79.
- Subbotkina, T. A., and M. F. Subbotkin. 2003. Lysozyme content in organs and blood serum in various species in the Volga River. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 39:537-546.
- Swain, P., S. K. Nayak, P. K. Nanda, and S. Dash. 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. Fish & Shellfish Immunology 25:191-201.
- Tort, L., J. C. Balasch, and S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroad between innate and adaptative responses. Immunologia:277-286.
- Watts, M., B. L. Munday, and C. M. Burke. 2001. Immune responses of teleost fish. Australian Veterinary Journal 79:570-574.
- Weber, T. E., B. C. Small, and B. G. Bosworth. 2005. Lipopolysaccharide regulates myostatin and MyoD independently of an increase in plasma cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Domestic Animal Endocrinology 28: 64-73.
- Yamamoto, M., K. Takeda, and S. Akira. 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. Molecular Immunology 40:861-868.
- Zapata, A. G., A. Chiba, and A. Varas. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. The fish immune system: organism, pathogen, and environment:1-62.

### **3. Outils multimédia**

- Euzéby, J. P., J.-M. Bouvier, S. Heleu, and B. Perrossier. 2008. Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire. Accès en ligne le 22 mai 2009, <http://www.bacterio.cict.fr/sbsv/sbsv.html>.

- General Statistics Office of Vietnam. 2009. Accès en ligne le 16 mars, [http://www.gso.gov.vn/default\\_en.aspx?tabid=491](http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=491).
- [www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/Kinsell/figure%252015-04.jpg](http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/Students/spring2006/Kinsell/figure%252015-04.jpg)
- <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi>
- [www.fishbase.org/search.php](http://www.fishbase.org/search.php)
- [www.gch.ulaval.ca/agarnier/GCH66295/microorganismes/lps.jpg](http://www.gch.ulaval.ca/agarnier/GCH66295/microorganismes/lps.jpg)
- [www.leucemie-espoir.org/IMG/jpg/Doc\\_1-19.jpg](http://www.leucemie-espoir.org/IMG/jpg/Doc_1-19.jpg)
- [www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen\\_main.jsp](http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp)
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- [http://2008.igem.org/wiki/images/0/0f/Ecoli\\_filament.jpg](http://2008.igem.org/wiki/images/0/0f/Ecoli_filament.jpg)
- [http://edk.admin.edition.fr/admin/gestion\\_doc/editeur/editeur.md/edocs/00/00/09/DF/media\\_Georgel\\_01.jpg](http://edk.admin.edition.fr/admin/gestion_doc/editeur/editeur.md/edocs/00/00/09/DF/media_Georgel_01.jpg)
- <http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2009/02/clip-image00213.gif>
- <http://hereticdhammasangha.files.wordpress.com>
- <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Secure/CaseNoTap/Tcellsynapse.jpg>
- <http://static.newworldencyclopedia.org>

## **VIII. ANNEXES**

### **PARTIE I – PROTOCOLES UTILISES**

Dans cette partie se trouvent les protocoles complets utilisés dans l'expérience et brièvement décrits dans la partie « Matériel et méthodes ».

#### **Annexe 1 – Dosage du glucose sanguin (plasma)**

##### **1. Matériel**

- 2,2'-azino-di(3-éthyl-benzothiazolin)-sulfonate – ABTS (Fluka 11557, Germany).
- Eau milliQ.
- Glucose (Sigma G8270, USA).
- Glucose oxydase Grad II (Sigma G6641, USA).
- HClO<sub>4</sub> (UCB 1064, Belgium).
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka 60353, Germany).
- Matériel biologique (plasma).
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (VWR 28027295, Belgium).
- Peroxydase Grad II (Sigma P6782, USA).

##### **2. Méthode**

- Préparation du tampon phosphate 0,1 M
  - Tampon 0,6 M
    - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 77,9 g/L H<sub>2</sub>O.
    - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 7,5 g/L H<sub>2</sub>O.
  - Tampon 0,1 M
    - 100 ml tampon 0,6 M dans 500 mL H<sub>2</sub>O.
    - pH 7,5.

- Préparation de la solution d'acide perchlorique 0,33 M
  - 28,35 ml HClO<sub>4</sub> dans 1 L H<sub>2</sub>O.
- Préparation du standard glucose 1 g/L
  - 100 mg glucose dans 100 ml H<sub>2</sub>O.
- Préparation de la solution réactionnelle
  - Glucose oxydase Grad II (4000 U/L, 73 U/ mg) : 29,4 mg/L.
  - Peroxydase Grad II (294 U/L, 136100 U/g) : 4 mg/L.
  - ABTS, Boehringer : 250 mg/L.
  - 1 L de tampon phosphate 0,1 M.
- Préparation des standard et des échantillons
  - Standard
    - Mettre 0, 5, 10, 20, 40, 50, 100 µL glucose standard in 100, 95, 90, 80, 60, 50, 0 µL tampon.
    - Ajouter 200 µL HClO<sub>4</sub> pour chaque concentration.
  - Echantillons
    - Mettre 25 µL échantillon dans 50 µL HClO<sub>4</sub>.
- Déprotéinisation
  - Agiter la préparation standard/échantillon.
  - Centrifuger pendant 10 minutes à 3000 rpm.
- Analyse
  - Mettre 25 µL de surnageant de déprotéinisation dans 2 mL de solution réactionnelle (tubes à hémolyse).
  - Mixer.
  - Mettre les tubes au bain-marie à 38°C pendant 15 minutes.
  - Lire la DO à 436 nm.

## **Annexe 2 – Dosage du cortisol sanguin (plasma)**

### **1. Matériel**

- Kit ELISA (DRG, USA).
- Matériel biologique (plasma).

### **2. Méthode**

- Diluer l'échantillon : 1, 2, 4, 8.
- Déposer 20  $\mu$ L de chaque standards (0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800) et d'échantillon dans les puits.
- Déposer 200  $\mu$ L d'enzyme conjuguée dans chaque puit.
- Bien mélanger pendant 10 secondes.
- Laisser incuber pendant **1 heure** à température ambiante.
- Vider le contenu des puits et rincer 3 fois avec de la solution de rinçage (400  $\mu$ L par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
- Ajouter 100  $\mu$ L de solution substrat à chaque puit.
- Laisser incuber pendant **15 minutes** à température ambiante.
- Stopper la réaction enzymatique en ajoutant 100  $\mu$ L de solution stop à chaque puit.
- Lire la DO à 450 nm dans les 10 minutes après avoir ajouté la solution stop.

## **Annexe 3 – Dosage du lysozyme sanguin (plasma) et splénique**

### **1. Matériel**

- Acide acétique (VWR 20104323, Belgium).
- Eau milliQ.
- Ethanol 95 % (VWR 1009832500, Belgium).
- Lysozyme Standard : 1000 u/mL (Sigma L7651, USA).

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 M, pH 6,2 (Acros 271060010, USA).
- Solution de *Micrococcus luteus* : 0,6 mg/mL (Sigma M3770, USA).
- Triton X-100 (Sigma T8787, USA).

## 2. Méthode

- Préparation du tampon 1
  - 100 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
  - 100  $\mu\text{L}$  Triton X-100.
  - 99 mL Ethanol 95%.
  - 1 mL Acide acétique.
  - Ajustement à pH 6,2.
- Préparation du tampon 2
  - Mettre 17,9 grammes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dans 1-L vial (recalculer la quantité selon l'humidité de la poudre : la concentration de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  doit être de 0,05 M).
  - Ajouter 800-900 mL d'eau distillée.
  - Ajuster à pH 6,2 avec de l'acide chlorhydrique concentré 1-10 M.
  - Compléter à exactement 1 L dans un ballon jaugé.
- Préparation des échantillons

### Plasma

- Dilution de l'échantillon de 0,5.  
Cela permet d'éviter une interférence due à la coloration propre du plasma. Il faudra comparer entre du plasma dilué et non dilué de *Pangasius*.

### Rate

- Broyer 10 mg de rate dans 30  $\mu\text{L}$  de tampon 1 (ou 20 mg dans 60  $\mu\text{L}$  ou un autre **rapport** de concentrations). Cela peut aussi être exprimé en u/ $\mu\text{g}$  de protéine.
- Centrifuger à 10 000 g pendant 5 min et stocker le surnageant à -80°C.

- Préparation du lysozyme standard
  - SL0
    - Mettre 20 mg de lysozyme (46 400 unit/mg) dans 20 mL de tampon 2 : cela porte la concentration à 46400 u/mL.
    - Faire très attention à la concentration de la bouteille, elle pourrait être différente de 46 400 u/mL. Dans ce cas, il suffit juste de recalculer les volumes corrects.
  - SL
    - Mettre 215 µL de SL0 dans 9,785 mL de tampon 2.
    - Cela porte la concentration à 1000 u/mL.
- Préparation des standards
  - S1 (100 u/mL) : 100 µL SL + 900 tampon 2.
  - S2 (150 u/mL) : 150 µL SL + 850 tampon 2.
  - S3 (200 u/mL) : 200 µL SL + 800 tampon 2.
  - S4 (250 u/mL) : 250 µL SL + 750 tampon 2.
  - S5 (300 u/mL) : 300 µL SL + 700 tampon 2.
  - S6 (350 u/mL) : 350 µL SL + 650 tampon 2.
  - S7 (400 u/mL) : 400 µL SL + 600 tampon 2.
  - S8 (450 u/mL) : 450 µL SL + 550 tampon 2.
  - Standard interne (SI) : pool des sérums de poisson.

Il est admis que les résultats d'un dosage peuvent varier d'une plaque à l'autre. Cela est dû à la variabilité des conditions expérimentales. Donc, si on utilise plusieurs microplaques, un standard interne permet une comparaison future entre plaques.
- Préparation de la solution de *M. luteus*
  - Mettre 30 mg de *M. luteus* dans 50 mL de tampon 2.
  - **Maintenir cette solution aussi fraîche que possible.**
- Préparation des microplaques
  - **Le fond des puits doit être plat** (et non en U), dans le but de permettre la lecture de la DO.



- La solution de *M. luteus* doit être ajoutée aux puits à la fin de la préparation des microplaques, juste avant la lecture de l'absorbance, car la lyse de *M. luteus* est vraiment très rapide.
- Solutions des microplaques

<u>Plasma</u>	<u>Rate</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Courbe standard : <b>20 µL standard (S1-S8, SI) + 130 µL <i>M. luteus</i>.</b></li> <li>▪ Echantillons : <b>10 µL échantillon + 10 µL tampon 2 + 130 µL <i>M. luteus</i>.</b></li> <li>▪ Blanc tampon : 150 µL tampon 2.</li> <li>▪ Blanc <i>M. luteus</i> : 150 µL <i>M. luteus</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Courbe standard : <b>10 µL standard (S1-S8, SI) + 130 µL <i>M. luteus</i>.</b></li> <li>▪ Echantillons : <b>2 µL échantillon + 8 µL tampon 2 + 130 µL <i>M. luteus</i>.</b></li> <li>▪ Blanc tampon : 140 µL tampon 2.</li> <li>▪ Blanc <i>M. luteus</i> : 140 µL <i>M. luteus</i>.</li> </ul>

- Lire à 450 nm.
  - Plasma : 0 min, 10, 20, 30, 40, selon l'activité de l'espèce.
  - Rate : 0 min, 15, 30, 45, 1h 00, 1h 15, 1h 30, 3h 00, selon l'activité de l'espèce.

#### Annexe 4 – Dosage des immunoglobulines sanguines (plasma)

##### 1. Matériel

- Matériel biologique (plasma).
- Polyéthylène glycol (PEG) 10000 (Fluka 92897, Germany).
- Réactif de Bradford (Bio-Rad 5000006, Germany).
- Sérum d'albumine bovine – BSA (Sigma A3294, USA).

## 2. Méthode

- Préparation de la droite d'étalonnage (BSA 1 mg/mL).
  - Préparer différentes concentrations d'étalon (2, 4, 6, 10, 20 µL BSA) et un blanc (5 µL d'H<sub>2</sub>O). **Faire en duplicat.**
  - Ajouter 1 mL de Bradford 5x.
  - Lire l'absorbance à 595 nm.
- Dosage des protéines du surnageant
  - Mettre dans un eppendorf 25 µL d'échantillon + 25 µL de PEG 12 % (précipitation).
  - **Laisser incuber 2 heures** à température ambiante en vortexant fréquemment.
  - Centrifuger pendant 10 minutes à 1000 ref.
  - Diluer le surnageant 10 fois : 5 µL d'échantillon + 45 µL d'H<sub>2</sub>O. **Faire en duplicat.**
  - Reprendre 5 µL de la dilution dans une cuvette.
  - Ajouter 1 mL de Bradford 5x.
  - Lire l'absorbance à 595 nm.
- Dosage des protéines totales
  - Diluer l'échantillon 10 fois : 5 µL d'échantillon + 45 µL d'H<sub>2</sub>O. **Faire en duplicat.**
  - Reprendre 5 µL de la dilution dans une cuvette.
  - Ajouter 1 mL de Bradford 5x.
  - Lire l'absorbance à 595 nm.

## Annexe 5 – Extraction d'ARN à partir de tissus frais

### 1. Matériel

- Chloroforme (VWR 22711324, Belgium).
- Eau milliQ stérile.
- Ethanol absolu (VWR 1009832500, Belgium).

- Ethanol 75 % froid (VWR 1009832500, Belgium).
- Isopropanol (2-propanol) (VWR R20839322, Belgium).
- Matériel biologique (échantillons de tissu frais).
- TRIzol (Invitrogen 15596018, USA).

## 2. Méthode

### **ATTENTION : Travailler sur glace et en RNase free (nettoyage avec SDS 1 %).**

- Mettre les morceaux d'organes (50 à 100 mg de tissu) dans **600 µL** de TRIzol **SUR GLACE**.

Prélever les organes avec des ustensiles (scalpel avec lame stérile, pince et ciseaux) autoclavés au préalable. Rincer entre chaque organe : d'abord à l'éthanol, ensuite à l'eau.

Utiliser des eppendorfs RNase free.

- Homogénéiser les tissus dans un potter préalablement stérilisé.  
Rincer le potter entre chaque échantillon : 3 rinçages (eau milliQ, alcool et eau stérile). Sécher avec un essuie-tout. Idéalement changer de potter entre différents organes.

S'il y a trop de gras ou trop de membranes : centrifuger pendant 10 minutes à 12000 rcf à 4°C. Ne garder que le surnageant. Eliminer le culot = restant de membrane et morceau en suspension = gras.

L'homogénat peut être stocké pendant 1 mois à -80°C.

- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter **200 µL** de chloroforme pour 600 µL de TRIzol.
- Secouer vigoureusement à la main pendant 15 secondes (**NE PAS VORTEXER**). La solution devient laiteuse.
- Incuber pendant 2-3 minutes à température ambiante.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 12000 rcf à 4°C.
- Prélever la phase aqueuse transparente supérieure (**ATTENTION ne pas trop s'approcher de l'interphase blanche pour éviter contamination avec ADN**) et transférer dans un nouvel eppendorf RNAase free.

- Ajouter **500 µL** d'isopropanol pour 600 µL de TRIzol et renverser le tube pour homogénéiser l'ensemble.
- Incuber pendant 10 minutes à température ambiante.  
La solution ARN-isopropanol peut être stockée à -20°C pendant 1 nuit.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 12000 rcf à 4°C.
- Eliminer le surnageant sans toucher au culot.
- Ajouter au moins **1 mL** d'éthanol 75 % **FROID** pour 600 mL de TRIzol au départ.  
La solution ARN-éthanol peut être stockée pendant 1 semaine à 4°C ou 1 an à -20°C.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 7500 rcf à 4°C.
- Recommencer le lavage à l'éthanol et la centrifugation.
- Eliminer précautionneusement le surnageant, spinner et retirer les dernières gouttes avec une pipette de 10.
- Resuspendre le culot dans **30 µL** d'eau milliQ stérile (ou DEPC ou RNase free) en faisant une cinquantaine d'allers-retours avec la pipette.  
Une incubation de 10 minutes à 55-65°C est envisageable pour faciliter la mise en suspension.
- **Diluer 100 fois (2 µL + 198 µL eau milliQ stérile).**
- Mesurer la DO au spectrophotomètre.  
Utiliser une cuvette spéciale ARN (Path 10 mm). Faire 2 mesures par échantillons.  
Bon résultats :  $DO(260/280) > 1,6$  ;  $DO(260/230) > 1$  ;  $0,5 < DO(260) < 1$  ;  $[ARN] > 150 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Ajuster dilution si besoin.
- Stocker à -80°C.

## **Annexe 6 – Reverse Transcription (RT)**

### **1. Matériel**

- dNTP mix (10mM) (Fermentas, USA).
- Eau milliQ stérile.
- Matériel biologique (ARN extrait à partir de tissus frais).
- Primer oligo (dT)18 (0,5 µg/µL) (Fermentas, USA).

- Reaction Buffer 5x (Fermentas, USA).
- Revertaid H minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ $\mu$ L) (Fermentas, USA).
- Riboblock Ribonuclease Inhibitor (20 u/ $\mu$ L) (Fermentas, USA).

## 2. Méthode

### **ATTENTION : Jamais plus de 30 sec en dehors de la glace.**

- Préparer le mix échantillons dans un petit eppendorf à PCR.
  - 4  $\mu$ g d'ARN.  
Il faut calculer le volume exacte de solution à prendre. Exemple : 920 ng/ $\mu$ L :  $4000/920 = 4,34 \mu$ L. **ATTENTION** : l'échantillon doit être assez dilué pour pipetter un volume aux alentours de 5 $\mu$ l (précision).
  - x  $\mu$ L de DEPC-treated water pour arriver à un volume final de 11  $\mu$ L (= 4  $\mu$ g d'ARN dans 11  $\mu$ l d'eau DEPC).
  - 1  $\mu$ L de Primer oligo (dT).  
➡ 12  $\mu$ L de volume total.
- Mixer légèrement et spiner 3-5 secondes pour tout ramener dans le bas du tube.
- Incuber pendant 5 minutes à 70°C (thermocycleur).
- Préparer le mix réactionnel (faire un mix pour le nombre d'échantillon avec un excès de 1 ou de 2).
  - 4  $\mu$ L Reaction Buffer 5x.
  - 1  $\mu$ L de Ribolock Ribonuclease Inhibitor.
  - 2  $\mu$ L de dNTP mix.
- Ajouter 7  $\mu$ l aux mix échantillons.  
➡ 19  $\mu$ L de volume total.
- Mixer légèrement et spiner 3-5 secondes pour tout amener dans le bas du tube.
- Incuber pendant 5 minutes à 37°C (thermocycleur).
- Ajouter 1  $\mu$ L de Revertaid aux mix échantillons.  
➡ 20  $\mu$ L de volume final.
- Incuber pendant 1 heure à 42°C (thermocycleur).
- Stopper la réaction en chauffant pendant 10 minutes à 70°C (thermocycleur).

- Stocker à -80°C.

## **Annexe 7 – Polymerase Chain Reaction (PCR)**

### **1. Matériel**

- Amorce sens (0,1µg/µL) (Eurogentec, Belgium).
- Amorce anti-sens (0,1µg/µL) (Eurogentec, Belgium).
- DNA Taq polymerase (GoTaq polymérase) (Promega, USA).
- dNTP mix (10mM) (Promega, USA).
- Eau milliQ stérile.
- Matériel biologique (ADNc produit par RT).
- PCR Reaction Buffer (GoTaq buffer 5x) (Promega, USA).

### **2. Méthode**

- Préparer le mélange réactionnel (préparer un mix pour tous les échantillons et compter un blanc de 45 µL ne contenant pas d'ADNc).
  - 31,75 µL d'eau milliQ stérile.
  - 1 µL de dNTP mix.
  - 10 µL de PCR Reaction Buffer (bouchon blanc) (GoTaq buffer 5x).
  - 1 µL d'amorce sens (50 µM).
  - 1 µL d'amorce anti-sens (50 µM).
  - 0,25 µL de DNA Taq polymerase (bouchon vert) (GoTaq polymérase).
  - ➡ 45 µL de volume total.
- Ajouter 45 µL de mix réactionnel à 5 µL d'ADNc.
- Mélanger et spinner brièvement.
- Placer le mélange dans le thermocycleur pour le programme de cycles PCR.
  - Dénaturation initiale : 10 minutes à 95°C.
  - Série de 40 cycles
    - Dénaturation : 1 minute à 95°C.

- Hybridation des amorces : 1 minute à x°C.
- Prolongement des amorces et synthèse d'ADN : 1 minute à 72°C.
- Prolongement des amorces et synthèse d'ADN : 10 minutes à 72°C.
- Tenir à 4°C.
- Stocker à -80°C.

## **Annexe 8 – Electrophorèse sur gel d'agarose**

### **1. Matériel**

- Agarose (Eurogentec EP001001, Belgium).
- Eau milliQ stérile.
- Ladder 100 bp (Promega, USA).
- Loadind dye 6x (Promega, USA).
- Matériel biologique (ADNc amplifié par PCR).
- SYBR Safe (Invitrogen S33102, USA).
- Tampon Tris/Acétate/EDTA (TAE) 1x (Acros 147850010, USA).

### **2. Méthode**

- Mélanger **500 mg** d'agarose dans **50 mL** de tampon TAE 1x.
- Porter à ébullition (au micro-onde) jusqu'à obtenir une solution limpide.
- Laisser refroidir 5-10 minutes jusqu'à pouvoir tenir le récipient en main.
- Ajouter **5 µL** de SYBR Safe.
- Couler la solution dans le support *ad hoc* muni d'un ou deux peigne(s) et laisser refroidir.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec du tampon TAE 1x et y immerger le gel.
- Préparer le mix échantillons
  - **5 µL** de produit PCR.
  - **3 µL** de loading dye 6x.
  - **10 µL** d'eau milliQ stérile.

- Mettre **5 µL** de ladder 100 bp (échelle) dans le premier puits.
- Faire migrer pendant 30 minutes à 80 V et à 60-70 mA.  
Les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode (+).
- Arrêter l'électrophorèse.
- Visualiser les différents fragments dans le gel sous UV.

## **Annexe 9 – Purification de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose**

### **1. Matériel**

- Agarose (Eurogentec EP001001, Belgium).
- Eau milliQ stérile.
- Kit Agarose Gel Extraction (QIAEX II) (QIAGEN, Germany).
- Loadind dye 6x (Promega, USA).
- Matériel biologique (ADNc amplifié par PCR).
- SYBR Safe (Invitrogen S33102, USA).
- Tampon Tris/Acétate/EDTA (TAE) 1x (Acros 147850010, USA).

### **2. Méthode**

#### **2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose**

- Mélanger **500 mg** d'agarose dans **50 mL** de tampon TAE 1x.
- Porter à ébullition (au micro-onde) jusqu'à obtenir une solution limpide.
- Laisser refroidir 5-10 minutes jusqu'à pouvoir tenir le récipient en main.
- Ajouter **5 µL** de SYBR Safe.
- Couler la solution dans le support *ad hoc* muni d'un ou deux peigne(s) à **double puit** et laisser refroidir.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec du tampon TAE 1x et y immerger le gel.
- Préparer le mix échantillons
  - **10 µL** de produit PCR.



- **3 µL** de loading dye 6x.
- **5 µL** d'eau milliQ stérile.
- Faire migrer pendant 30 minutes à 80 V et à 60-70 mA.  
Les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode (+).
- Arrêter l'électrophorèse.
- Visualiser les différents fragments dans le gel sous UV.

## **2.2. Purification d'ADN**

- Couper la bande d'ADN désirée en utilisant un scalpel stérile.
- Placer le morceau de gel d'agarose dans un tube eppendorf de 1,5 mL stérile (tarer le tube avant).
- Déterminer la masse du gel.
- Ajouter dans le tube **300 µL** de tampon QX1 pour 100 mg de gel d'agarose.
- Vortexer le tube pendant 30 secondes pour suspendre le gel dans le tampon.
- Ajouter **30 µL** de QIAEX dans le tube et vortexer.
- Incuber pendant 10 minutes à 50°C au bain-marie et vortexer les tubes brièvement toutes les 2 minutes durant l'incubation.
- Centrifuger le tube à vitesse maximale pendant 30 secondes et éliminer surnageant, en ne gardant que le culot.
- Rincer le culot avec **500 µL** de tampon QX1 (resuspendre le culot en vortexant, centrifuger l'échantillon pendant 30 secondes et enlever l'éluat avec une pipette).
- Nettoyer 2 fois le culot avec **500 µL** de tampon PE.
- Laisser sécher le culot pendant 15 minutes à température ambiante jusqu'au moment où le centre du culot devienne blanc (laisser les bords translucides).
- Pour éluer l'ADN, ajouter **20 µL** d'eau milliQ stérile, resuspendre le culot en vortexant et incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger pendant 30 secondes et transvaser à l'aide d'une pipette le surnageant (ADN purifié) dans un tube eppendorf stérile propre.

## **Annexe 10 – Clonage en bactéries**

### **1. Matériel**

- Agar (15 g/L) (Merck 1614, Germany).
- Ampicilline (50 mg/mL) (GIBCO, USA).
- Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA).
- Matériel biologique (ADNc purifié à partir du gel d'agarose).
- Milieu Luria Broth LB (20 g/L).
  - Extrait de levure (5 g/L).
  - NaCl (5 g/L).
  - Tryptone (10 g/L).
- Milieu SOC.
- « One-Shot *E. coli* ».
- X-Gal (50 mg/mL) (Promega, USA).

### **2. Méthode**

#### **2.1. Préparation des milieux de culture**

- Mélanger 25 mL de milieu LB et 3,75 mg d'agar.
- Autoclaver le milieu de culture.
- Ajouter 1 µL/mL milieu d'ampicilline et 1 µL/mL milieu de X-Gal lorsque le milieu est encore liquide (mais pas trop chaud).
- Couler le milieu de culture dans une boîte de Pétri.

#### **2.2. Préparation du mélange réactionnel**

- Préparer le mélange réactionnel (tube eppendorf de 1,5 mL)
  - 4 µL d'ADN purifié.
  - 1 µL de salt solution.

- 1  $\mu\text{L}$  de TOPO Vector.
- ➔ 6  $\mu\text{L}$  de volume total.
- Mélanger doucement et incubé pendant 5 minutes à température ambiante.
- Placer le tube sur glace.

### **2.3. Mise en culture des bactéries transformées**

- A partir de maintenant : **TRAVAILLER EN CONDITIONS STERILES** (avec un bec bunsen).
- Décongeler les bactéries sur glace.
- Ajouter 2  $\mu\text{L}$  du mélange réactionnel au tube eppendorf de « One-Shot *E. coli* » (au  $-80^{\circ}\text{C}$ ) et mélanger doucement.
- Incuber sur glace pendant 30 minutes.
- Provoquer un choc thermique des cellules pendant 30 secondes à  $42^{\circ}\text{C}$  (bain-marie) sans secouer.
- Placer sur glace pendant 2 minutes.
- Ajouter 250  $\mu\text{L}$  de milieu SOC (chauffé à température ambiante) aux cellules (**NE PAS FAIRE D'ALLER-RETOURS AVEC LA PIPETTE**).
- Agiter le tube **HORIZONTALEMENT** pendant 1 heure à 225 rpm à  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Mettre les boîtes de Pétri contenant du milieu LB-agar à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant au moins 30 minutes.
- Etaler 50-100  $\mu\text{L}$  de cellules dans les boîtes de Pétri (pipette pasteur stérile déformée pour faire un « rateau »).  
Stocker le restant à  $4^{\circ}\text{C}$  (utilisation ultérieure possible).
- Incuber les boîtes toute la nuit à  $37^{\circ}\text{C}$  (centaines de colonies visibles après 8 heures et discrimination blanc/bleu après 12 heures).
- Détecter les bactéries transformées (**blanches**) par le test blanc/bleu.
- Repiquer les colonies blanches sur un nouveau milieu LB-agar contenant de l'ampicilline et du X-Gal.

## **Annexe 11 – PCR à partir d'un clonage en bactéries**

### **1. Matériel**

- Amorce **M13** sens (0,1µg/µL) : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (Eurogentec, Belgium).
- Amorce **M13** anti-sens (0,1µg/µL) : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (Eurogentec, Belgium).
- DNA Taq polymerase (GoTaq polymérase) (Promega, USA).
- dNTP mix (10mM) (Promega, USA).
- Eau milliQ stérile.
- Matériel biologique (ADNc produit par RT).
- PCR Reaction Buffer (GoTaq buffer 5x) (Promega, USA).

### **2. Méthode**

- Préparer le mélange réactionnel (préparer un mix pour tous les échantillons et compter un blanc de 50 µl ne contenant pas d'ADNc).
  - **40,75 µL** d'eau milliQ stérile.
  - **1 µL** de dNTP mix.
  - **5 µL** de PCR Reaction Buffer (bouchon blanc) (GoTaq buffer 5x).
  - **1 µL** d'amorce M13 sens (50 µM).
  - **1 µL** d'amorce M13 anti-sens (50 µM).
  - **0,25 µL** de DNA Taq polymerase (bouchon vert) (GoTaq polymérase).
  - ➡ **49 µL de volume total.**
- Ajouter aux **50 µL** de mix réactionnel des cellules bactériennes : à l'aide d'un tips, piquer dans une colonie bactérienne (blanche) et tremper le bout du tips dans le mix (**ne pas mettre trop de bactéries**).
- Mélanger et spiner brièvement.
- Placer le mélange dans le thermocycleur pour le programme de cycles PCR.
  - Dénaturation initiale : 10 minutes à 95°C.

- Série de 30 cycles
  - Dénaturation : 1 minute à 95°C.
  - Hybridation des amorces : 1 minute à 55°C.
  - Prolongement des amorces et synthèse d'ADN : 1 minute à 72°C.
- Prolongement des amorces et synthèse d'ADN : 10 minutes à 72°C.
- Tenir à 4°C.
- Stocker à -80°C.
- Procéder à une vérification du produit PCR par une électrophorèse sur gel d'agarose.

## **Annexe 12 – Real Time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)**

### **1. Matériel**

- Amorces sens et anti-sens (Eurogentec, Belgium).
- Eau milliQ stérile.
- Matériel biologique (ADNc produit par RT).
- SYBR Green Master mix (???)

### **2. Méthode**

- Préparer l'ADNc à ajouter dans la plaque Q-PCR : diluer 50 fois.
  - Dilution 10 : 10 µL d'ADNc dans 90 µL d'eau milliQ stérile.
  - Dilution 50 : 30 µL d'ADNc (d10) dans 120 µL d'eau milliQ stérile.
- Préparer la courbe standard : ADNc dilué 25, 50, 100, 200, 400 fois.
  - Dilution 25 : 40 µL d'ADNc (2 µL\*20 échantillons) dans 960 µL d'eau milliQ stérile.
  - Dilutions 50, 100, 200, 400 : 500 µL d'ADNc (d n-1) dans 500 µL d'eau milliQ stérile.
- Préparer le mélange réactionnel (préparer un mix pour tous les échantillons et).
  - **10 µL** de SYBR Green mix.
  - **2,5 µL** d'amorce sens (5 µM).

- 2,5 µL d'amorce anti-sens (5 µM).
- ➡ 15 µL de volume total.
- Ajouter 15 µL de mix réactionnel à 5 µL d'ADNc.
- ➡ 20 µL de volume final.
- Mélanger brièvement.
- Placer le mélange dans la machine Q-PCR.

## **PARTIE II – RESULTATS**

Dans cette partie seront présentés l'ensembles des résultats de l'expérience ayant servi à la réalisation de l'analyse statistique.

N° tank	Repos	E*B	[LPS]	Glucose	Cortisol	Lysozyme P	Lysozyme R	Ig
1	Non	1	0	12,75	57,74714528	686,7912	1266,192	18837,07865
2	Non	1	0	11,83088235	45,46231262	ND	1456,564	ND
3	Non	1	0	13,70588235	154,9203159	ND	1215,1995	15115,16854
4	Non	1	0	9,955882353	109,6853774	470,9518	1514,3555	24719,10112
5	Non	1	0,5	10,65441176	58,84278326	ND	1507,5565	ND
6	Non	1	0,5	13,26470588	93,96086149	626,2799333	1357,9785	8120,786517
7	Non	1	0,5	12,56617647	91,66893694	536,09475	1252,594	17960,67416
8	Non	1	0,5	11,5	82,33425228	ND	1718,3255	ND
9	Non	1	5	13,15441176	82,33425228	593,017	1157,408	5039,325843
10	Non	1	5	13,08088235	79,54425681	465,866	973,835	18469,10112
11	Non	1	5	14,40441176	82,33425228	ND	1708,127	ND
12	Non	1	5	14,07352941	106,8076461	569,361	1612,941	17095,50562
1	Non	2	0	10,65441176	89,46018884	580,3009	1446,3655	16132,02247
2	Non	2	0	9,808823529	90,55439475	545,2806	1293,388	ND
3	Non	3	0	10,02941176	124,1299678	749,6848	1840,7075	7404,494382
4	Non	3	0	12,49264706	106,8076461	761,12	1942,6925	1750
5	Non	2	0,5	9,845588235	66,21234546	666,0649	1568,7475	6665,730337
6	Non	2	0,5	10,83823529	184,6115101	700,1322667	1653,735	15469,10112
7	Non	3	0,5	9,955882353	115,7889645	663,985	1918,896	5845,505618
8	Non	3	0,5	17,41911765	129,5516174	819,597125	1932,494	3224,719101
9	Non	2	5	12,60294118	81,38765576	501,35	1289,9885	8699,438202

10	Non	2	5	9,551470588	72,00441527	620,738875	1408,971	6786,516854
11	Non	3	5	10,98529412	137,3158736	654,83265	1810,112	17671,34831
12	Non	3	5	8,448529412	129,5516174	750,18028	1867,9035	6247,191011
1	Non	4	0	12,49264706	85,27801949	519,83728	1157,408	17193,82022
2	Non	4	0	10,83823529	129,5516174	648,1974	1646,936	13564,60674
3	Non	5	0	10,21323529	102,694021	660,49024	1833,9085	26435,39326
4	Non	5	0	12,49264706	122,3944598	564,18625	1922,2955	24014,04494
5	Non	4	0,5	10,875	56,68556322	604,2536	1507,5565	14969,10112
6	Non	4	0,5	11,79411765	154,9203159	550,1405	1657,1345	10814,60674
7	Non	5	0,5	12,71323529	84,27905695	546,80548	1646,936	17005,61798
8	Non	5	0,5	11,72058824	157,337306	526,97016	1538,152	17016,85393
9	Non	4	5	10,36029412	102,694021	552,58032	1633,338	5053,370787
10	Non	4	5	11,83088235	100,0798746	481,77576	1245,795	13359,55056
11	Non	5	5	11,13235294	101,3745078	507,637	1765,9185	8887,640449
12	Non	5	5	11,79411765	79,54425681	614,346	1759,1195	9410,11236
13	Oui	1	0	8,007352941	97,79312392	498,98	1511,355	7958,333333
14	Oui	1	0	7,786764706	117,518812	461,309	1551,51525	20179,92424
15	Oui	1	0	6,647058824	146,1438101	536,218	1270,3935	17924,24242
16	Oui	1	0	8,669117647	96,24277899	567,708	1465,01625	11164,77273
17	Oui	1	0,5	6,647058824	101,0049394	697,756	1468,1055	3564,393939
18	Oui	1	0,5	8,558823529	107,9038548	607,84	1273,48275	21458,33333
19	Oui	1	0,5	6,169117647	93,24810586	369,4428	1224,05475	15547,34848
20	Oui	1	0,5	6,169117647	140,7423109	450,519	1285,83975	11390,15152
21	Oui	1	5	8,889705882	109,7344467	331,3917	1264,215	32471,59091
22	Oui	1	5	6,5	185,3526324	526,6888	1112,84175	18609,84848
23	Oui	1	5	7,419117647	174,324975	580,8418	1647,282	5064,393939
24	Oui	1	5	6,794117647	138,1449242	560,384	1427,94525	13015,15152
13	Oui	3	0	7,713235294	138,1449242	451,35	1545,33675	17244,31818
14	Oui	3	0	5,360294118	177,9001557	525,393	1687,44225	25039,77273
15	Oui	2	0	4,698529412	102,6685547	625,1562	1619,47875	14342,80303
16	Oui	2	0	7,382352941	143,4078937	659,0464	1582,40775	22740,5303
17	Oui	3	0,5	4,735294118	123,8819322	749,8768	1619,47875	16284,09091
18	Oui	3	0,5	5,176470588	109,7344467	724,5784	1545,33675	26195,07576
19	Oui	2	0,5	6,573529412	325,9538101	433,01052	1514,44425	22863,63636
20	Oui	2	0,5	5,286764706	140,7423109	427,6386	1341,44625	17787,87879

21	Oui	3	5	5,25	157,8362889	433,30896	1693,62075	18734,84848
22	Oui	3	5	4,625	76,76608946	816,82854	1693,62075	31155,30303
23	Oui	2	5	7,088235294	72,57097447	623,68284	1295,1075	27784,09091
24	Oui	2	5	6,794117647	81,34006918	556,1721	1427,94525	27513,25758
13	Oui	5	0	9,882352941	83,78232752	573,456	1746,138	21089,01515
14	Oui	5	0	5,985294118	181,5749469	459,144	1675,08525	22782,19697
15	Oui	4	0	0,433823529	61,89976814	573,456	1761,58425	14876,89394
16	Oui	4	0	3,779411765	121,7078972	548,342	1755,40575	19708,33333
17	Oui	5	0,5	15,17647059	104,3721306	610,2784	1709,067	27388,25758
18	Oui	5	0,5	8,301470588	104,3721306	629,176	1468,1055	8223,484848
19	Oui	4	0,5	5,286764706	106,1168301	548,0992	1168,44825	23625
20	Oui	4	0,5	6,022058824	51,09961646	392,42268	1415,58825	26636,36364
21	Oui	5	5	7,235294118	87,65619479	373,1733	1705,97775	20941,28788
22	Oui	5	5	7,455882353	66,02932423	620,79468	1755,40575	19964,01515
23	Oui	4	5	7,860294118	101,0049394	459,41874	1668,90675	23136,36364
24	Oui	4	5	9,147058824	388,7542255	508,87848	1582,40775	22098,48485

**Légende E\*B : modalité concaténée Période d'échantillonnage\*Injection bactérienne**

	Temps	Bactéries					
1	1	Non					
2	2	Non					
3	2	Oui					
4	3	Non					
5	3	Oui					



